

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



Proteomická a funkční charakterizace izoforem PsbO

Proteomic and functional characterization of PsbO isoforms

Miloš Duchoslav

Diplomová práce
Praha 2012

Vedoucí práce:

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Lukáše Fischera, Ph.D. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7.8.2012

Miloš Duchoslav

Obsah

Obsah	4
Poděkování	9
Seznam použitých zkratk	10
Abstrakt	13
Klíčová slova	13
Abstract.....	14
Key words	14
1 Úvod	15
1.1 Cíle	16
2 Literární přehled	17
2.1 Fotosystém II.....	17
2.1.1 Funkce fotosystému II	17
2.1.2 Určování struktury fotosystému II.....	18
2.1.3 Membránové podjednotky fotosystému II.....	20
2.1.4 Struktura a funkce kyslík-uvolňujícího centra (OEC)	20
2.1.5 Vnější proteiny fotosystému II	21
2.1.5.1 Uspořádání vnější proteinů na fotosystému II	22
2.1.6 Světlosběrné komplexy fotosystému II	23
2.2 PsbO	25
2.2.1 Primární struktura PsbO	25
2.2.2 Sekundární a terciární struktura PsbO	26
2.2.3 Dynamika struktury PsbO.....	27
2.2.4 Interakce s Ca^{2+}	28
2.2.5 Interakce PsbO s fotosystémem II	29
2.2.6 Stechiometrie vazby PsbO na fotosystém II.....	31
2.2.7 Funkce PsbO	32
2.2.7.1 Důsledky inaktivace genu psbO	32
2.2.7.2 Stabilizace Mn_4CaO_5 klastru	32
2.2.7.3 Tvorba kanálu pro vodu, protony a kyslík.....	33
2.2.7.4 GTPázová aktivita PsbO	33

2.2.7.5	Funkce PsbO v recyklaci proteinu D1	34
2.2.7.6	Vliv PsbO na strukturu superkomplexu PSII-LHCII	34
2.2.7.7	Úloha vnějších proteinů ve tvorbě gran	35
2.2.8	Izoformy PsbO a jejich specifické funkce.....	36
3	Metodika	38
3.1	Kultivované rostliny	38
3.1.1	Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.) cv. Lada	38
3.1.1.1	LS médium	38
3.2	Práce s nukleovými kyselinami	38
3.2.1	Bakteriální kmen použitý pro práci s nukleovými kyselinami.....	38
3.2.2	Izolace genomové DNA (gDNA) z listů bramboru	39
3.2.2.1	Roztoky pro izolaci DNA.....	39
3.2.2.2	Postup izolace.....	39
3.2.3	Izolace RNA z listů bramboru.....	40
3.2.4	Měření koncentrace nukleových kyselin.....	40
3.2.5	Reverzní transkripce.....	41
3.2.5.1	Digesce DNA (reakce v objemu 10 µl).....	41
3.2.5.2	Reverzní transkripce (reakce v objemu 20 µl)	41
3.2.6	Primery	41
3.2.7	PCR	42
3.2.8	Agarózová DNA elektroforéza.....	42
3.2.9	Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu	43
3.2.10	Ligace PCR fragmentů do vektoru <i>pDrive</i>	43
3.2.11	Příprava kompetentních buněk pro transformaci teplotním šokem (RbCl metoda)	43
3.2.12	Transformace <i>E. coli</i> plasmidovou DNA (metoda teplotního šoku).....	44
3.2.13	Příprava glycerolových konzerv z kultur <i>E. coli</i>	45
3.2.14	Izolace plasmidů z <i>E. coli</i>	45
3.2.15	Kontrola plasmidů štěpením	45
3.2.16	Sekvenace.....	46
3.2.16.1	Primery	46
3.2.16.2	Příprava vzorků	46

3.3	Analýza tylakoidních proteinů	46
3.3.1	Izolace tylakoidů.....	46
3.3.2	Měření koncentrace proteinů (Bio-Rad Protein Assay).....	47
3.3.3	Analýza tylakoidních proteinů pomocí 2D IEF-SDS PAGE (dvourozměrné elektroforézy s izoelektrickou fokusací)	47
3.3.4	Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) proteinů štěpených trypsinem	49
3.4	Exprese a purifikace PsbO	50
3.4.1	Expresní vektory	50
3.4.2	Expresní kmeny <i>E. coli</i>	51
3.4.3	Autoindukční médium	52
3.4.4	Pufry pro purifikaci.....	53
3.4.5	Test exprese PsbO v malém měřítku	53
3.4.5.1	Kultivace expresní kultury	53
3.4.5.2	Purifikace proteinu v malém měřítku	54
3.4.6	Exprese proteinu ve velkém měřítku	54
3.4.6.1	Kultivace expresní kultury.....	54
3.4.6.2	Sklizení expresní kultury	54
3.4.6.3	Příprava a údržba kolonek	55
3.4.6.4	Izolace fúzního proteinu – 1. afinitní chromatografie	55
3.4.6.5	Proteolytické štěpení fúzního proteinu	55
3.4.6.6	Výměna pufru	56
3.4.6.7	Izolace odštěpeného proteinu PsbO – 2. afinitní chromatografie.....	56
3.4.6.8	Zakoncentrování PsbO.....	56
3.4.6.9	Gelová filtrace.....	57
3.4.7	Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) celých proteinů	57
3.4.8	CD spektrometrie.....	57
3.4.9	Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)	58
3.4.10	Barvení polyakrylamidových gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue	59
3.5	<i>In silico</i> analýzy	59
3.5.1	Práce se sekvencemi mRNA.....	59
3.5.2	Práce s genomovými sekvencemi	60

3.5.3	Homologní modelování struktury PsbO2 bramboru	60
3.5.4	Výpočet izoelektrického bodu a hmotnosti proteinu.....	61
4	Výsledky	62
4.1	Izolace genomové a cDNA verze genů kódujících PsbO v bramboru	62
4.1.1	Popis a uspořádání experimentu.....	62
4.1.2	Výsledky.....	63
4.1.2.1	Příprava cDNA genu psbO2 z bramboru	63
4.1.2.2	Izolace genomových sekvencí psbO1 a psbO2	63
4.2	Identifikace proteinových spotů PsbO na gelu z 2D IEF-SDS PAGE	65
4.2.1	Popis a uspořádání experimentu.....	65
4.2.2	Výsledky.....	65
4.3	Expres <i>psbO</i> v <i>E. coli</i> a následná purifikace a analýzy rekombinantního proteinu	69
4.3.1	Popis a uspořádání experimentu.....	69
4.3.2	Výsledky.....	69
4.3.2.1	Testovací exprese a purifikace v malém měřítku.....	69
4.3.2.2	Výběr vhodného expresního kmene a nosičového proteinu.....	73
4.3.2.3	Expres a purifikace ve velkém měřítku	73
4.3.2.4	Gelová filtrace	74
4.3.2.5	Hmotnostní spektrometrie	75
4.3.2.6	CD spektrometrie	76
4.4	Bioinformatické analýzy.....	77
4.4.1	Porovnání kódujících a aminokyselinových sekvencí genů <i>psbO</i> vybraných druhů rostlin.....	77
4.4.1.1	Popis a uspořádání experimentu.....	77
4.4.1.2	Výsledky.....	78
4.4.2	Hledání rozdílů mezi izoformami (mezi druhy a v rámci druhů)	82
4.4.2.1	Popis a uspořádání experimentu.....	82
4.4.2.2	Výsledky.....	82
4.4.3	Zobrazení rozdílů mezi izoformami a rozdílů mezi druhy na model terciární struktury PsbO	88
4.4.3.1	Popis a uspořádání experimentu.....	88

4.4.3.2	Výsledky	89
4.4.4	Aminokyselinové složení PsbO	92
4.4.5	Srovnání genomových sekvencí PsbO	92
4.4.5.1	Popis a uspořádání experimentu	92
4.4.5.2	Výsledky	92
5	Diskuze	94
5.1	Identifikace proteinových spotů PsbO na gelu z 2D IEF-SDS PAGE	94
5.2	Evoluce PsbO	95
5.2.1	Počet izoform PsbO	95
5.2.2	Evoluce izoform PsbO	96
5.2.3	Rozdíly mezi izoformami	99
5.3	Dimerizace PsbO a jeho funkce ve skládání gran	100
5.4	Vliv pH na strukturu PsbO	102
6	Závěry	104
6.1	Identifikace proteinových spotů PsbO bramboru na gelu z 2D IEF-SDS PAGE a izolace příslušných genů	104
6.2	Expres psbO v <i>E. coli</i> a následná purifikace a analýzy rekombinantního proteinu	104
6.3	Bioinformatické analýzy	104
6.3.1	Počet izoform PsbO	104
6.3.2	Evoluce a funkce izoform PsbO	104
7	Použitá literatura	106

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří mi byli jakkoliv nápomocni s vypracováním této diplomové práce. Můj dík patří především mému školiteli Lukáši Fischerovi za cenné rady, ochotu o čemkoliv diskutovat a s čímkoliv pomoci, podporu a velmi přátelský přístup. Děkuji též všem kolegům z Lab 210 – Lence, Mirkovi, Mířovi, Vojtovi, Báře a laborantce Halce za pomoc, rady a velice příjemné prostředí. Poděkovat bych chtěl rovněž dalším lidem z Katedry experimentální biologie rostlin, především Standovi Vosolsobě za plodné diskuze a pomoc s proteomickými experimenty.

Za změření hmotnostních spekter proteinů bych chtěl poděkovat Petru Jedelskému a Mirce Šedinové z Laboratoře hmotnostní spektrometrie PřF UK. Mirce děkuji také za vnášení alespoň částečného řádu do světa chaosu.

I would like to thank all the people from Umeå Plant Science Centre that were nice to me and helped me during my stay in Umeå. Most of all I want to thank Göran Samuelsson for giving me the opportunity to work in his lab, for his support of me and my ideas and for being very friendly. I thank Jan Karlsson for introducing me to recombinant protein expression and purification and for experienced technical support. I would like to thank my lab-mate Umut Rende for help with basic lab work, for taking care of the lab when nobody else did it and for being good friend. Tack så mycket!

I appreciate also the help from people from Umeå University's Department of Chemistry. I want to thank Christin Grundström for help with gel filtration, Uwe Sauer for introducing me to CD spectrometry, Thomas Kieselbach for precise mass spectrometry analysis of recombinant protein and for fruitful discussion and Wolfgang Schröder for many good advices.

Na závěr bych chtěl poděkovat za velkou podporu a trpělivost své rodině a svým blízkým a omluvit se všem, které jsem v průběhu sepisování práce odbýval, že nemám čas.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT COST OC08046 a GA UK 362211.

Seznam použitých zkratk

2D IEF-SDS PAGE	two dimensional isoelectric focusing - sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (dvourozměrná elektroforéza s izoelektrickou fokusací)
ANS	8-anilinonaftalen-1-sulfonát
BSA	bovine serum albumin (albumin z hovězího séra)
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA nasyntetizovaná podle mRNA)
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	dithiothreitol (redukční činidlo)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (gramnegativní bakterie využívaná v molekulární biologii)
EDC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(<i>N,N</i> -dimethyl-3-aminopropyl)karbodiimid (propojovací činidlo)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid (kyselina ethylenglykoltetraoctová)
EST	expressed sequence tag (krátký sekvenovaný úsek cDNA)
FTIR	Fourier transform infrared spectrometry (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací)
gDNA	genomic DNA (genomová DNA)
GDP	guanosindifosfát
GF	gelová filtrace (molekulová vylučovací chromatografie – size exclusion chromatography – ve vodném prostředí)
GTP	guanosintrifosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
IEF	isoelectric focusing (izoelektrická fokusace)
IPG	immobilized pH gradient (imobilizovaný pH gradient)
LA	lysogeny agar (pevné bakteriální médium, někdy označováno jako pevné LB médium)
LB	lysogeny broth (tekuté bakteriální médium)
LHCII	light-harvesting complex II (světlosběrný komplex II)
LMW	low molecular weight (s nízkou molekulovou hmotností)
LS	Linsmaier and Skoog medium (médium pro kultivaci lilku bramboru)
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization (matricí zprostředkovaná laserová desorpce/ionizace, ionizační metoda užívaná v hmotnostní spektrometrii)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)ethansulfonová kyselina
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MW	molecular weigh (molekulová hmotnost)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace v USA, správce mnoha databází)

OD	optická denzita (případná hodnota v indexu udává vlnovou délku)
OEC	oxygen evolving center (kyslík-uvolňující centrum)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (polyakrylamidová gelová elektroforéza)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride (fenylmethylsulfonyl fluorid)
PSII	photosystem II (fotosystém II)
PUT	PlantGDB-assembled unique transcript (contigy poskládané správci databáze PlantGDB z dostupných sekvencí mRNA a cDNA, především EST)
SDS	sodium dodecyl sulphate (dodecylsírán sodný)
SOB	super optimal broth (vydatné bakteriální médium)
SOC	super optimal broth with catabolite repression (vydatné bakteriální médium s přidanou glukózou)
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer (elektroforetický pufr)
TEMED	tetramethylethylenediamin
TEV proteáza	tobacco etch virus protease (virová cysteinová proteáza s vysokou specifitou)
TOF	time-of-flight (metoda hmotnostní spektrometrie, při které je určován poměr hmotnosti ku náboji částice pomocí měření času letu částice)
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
u	unit of enzyme activity (jednotka aktivity enzymu)
UTR	untranslated region (oblast mRNA nepřekládaná do proteinu)

Pro lepší čitelnost jsou v některých případech v textu užívány zkrácené české názvy rostlin. Zde jsou uvedeny jejich plné významy:

špenát	<i>Spinacia oleracea</i>
brambor	<i>Solanum tuberosum</i>
rajče	<i>Solanum lycopersicum</i>
huseníček	<i>Arabidopsis thaliana</i>
řeřišničník	<i>Arabidopsis lyrata</i>
tolice	<i>Medicago truncatula</i>
rýže	<i>Oryza sativa</i>
pšenice	<i>Triticum aestivum</i>
ječmen	<i>Hordeum vulgare</i>
kukuřice	<i>Zea mays</i>
vraneček	<i>Selaginella moellendorffii</i>
čepenka	<i>Physcomitrella patens</i>
kurkuma	<i>Curcuma longa</i>
fazol	<i>Phaseolus vulgaris</i>
sója	<i>Glycine max</i>
štírovník	<i>Lotus japonicus</i>
réva	<i>Vitis vinifera</i>
maniok	<i>Manihot esculenta</i>
zázvor	<i>Zingiber officinale</i>
topol	<i>Populus sp.</i>

V některých případech je kvůli praktickému využití složení pufrů uváděno pro pufr v koncentrované formě, která je pak naředěna. Například označení *5x nanášecí pufr* znamená *5x koncentrovaný nanášecí pufr*. Takový pufr je před použitím 5x zředěn.

Kvůli lepší čitelnosti textu byly také *aminokyselinové zbytky* v proteinech označovány pouze jako *aminokyseliny*, ač to není terminologicky zcela správné. Je-li v textu v souvislosti s proteiny uveden například *histidin*, jedná se o *histidinový zbytek* a podobně.

Abstrakt

PsbO (mangan-stabilizující protein) je jedním z vnějších proteinů fotosystému II vázaných z lumenální strany. Nachází se ve všech oxyfototrofních organismech a zajišťuje správnou funkci Mn_4CaO_5 klastru, kde probíhá fotosyntetický rozklad vody.

Tato práce je zaměřena především na PsbO vyšších rostlin a jeho izoformy – jejich evoluci a funkce. Bioinformatickými analýzami jsme zjistili, že většina vyšších rostlin exprimuje právě dvě izoformy *psbO*. Fylogenetický strom vytvořený ze sekvencí PsbO má neobvyklou topologii. Na jednotlivé vzájemně paralogní izoformy se neštěpí u báze, jak by se dalo očekávat, ale spíše až na koncích jednotlivých větví, na úrovni čeledí či ještě nižších taxonomických jednotek. V práci jsme navrhli a diskutovali několik hypotéz evoluce izoform PsbO.

Součástí práce byla detailní identifikace spotů na gelech z 2D IEF-SDS PAGE tylakoidů bramboru, ve kterých se vyskytuje PsbO. Ve většině spotů jsme identifikovali konkrétní variantu izoformy. Nepodařilo se nám nalézt žádné posttranslační modifikace PsbO.

Optimalizovali jsme metodu exprese *psbO* špenátu v *E. coli* a následné purifikace, která umožňuje získat velké množství správně sbaleného rekombinantního proteinu. Pomocí CD spektrometrie jsme zjistili, že při změnách pH typických pro lumen tylakoidů při změně osvětlení se mírně mění konformace PsbO. Potvrdili jsme, že rekombinantní protein tvoří v roztoku dimery. Diskutujeme možnost, že PsbO hraje roli v tvorbě gran prostřednictvím interakce mezi fotosystémy II v protilehlých membránách.

Klíčová slova

PsbO, mangan-stabilizující protein, MSP, fotosystém II, evoluce izoform, 2D IEF-SDS PAGE

Abstract

PsbO (manganese-stabilizing protein) is the largest extrinsic protein of photosystem II, located on the lumen side of photosystem. It is present in all known oxyphototrophic organisms. PsbO facilitates photosynthetic water splitting, which takes place in an oxygen evolving center (Mn_4CaO_5 cluster) of photosystem II.

This work is focused on PsbO of higher plants and its isoforms, particularly their evolution and functions. Bioinformatic analyses revealed that majority of higher plants express exactly two *psbO* isoforms. A phylogenetic tree of PsbO sequences has an unusual topology. The two paralogous isoforms do not diverge at the base of the phylogenetic tree, as anticipated, but rather at the end of particular branches, at the level of family or lower taxonomic unit. In this work we propose and discuss several hypotheses concerning evolution of PsbO isoforms.

The work further includes detailed analysis and identification of protein spots assigned to PsbO on 2D IEF-SDS PAGE gels of potato thylakoid proteins. We identified predominant version of PsbO isoform in most of the spots. We did not succeed to find any posttranslational modification.

We optimized a method of *psbO* expression in *E. coli* and subsequent purification, which yielded relatively big amount of properly folded recombinant protein. Analysis of CD spectra implied that conformation of PsbO is slightly different at pH typical for thylakoid lumen in the dark and light. We verified that PsbO forms dimers in a solution. We discuss a possibility that PsbO is involved in grana stacking by formation of dimers connecting photosystems II in opposite thylakoid membranes.

Key words

PsbO, manganese-stabilizing protein, MSP, photosystem II, evolution of isoforms, 2D IEF-SDS PAGE

1 Úvod

Oxygenní fotosyntéza je pravděpodobně nejdůležitější proces na Zemi, při němž organizmy získávají energii ze Slunce. Světelná energie je při ní využívána k rozkladu vody na kyslík, protony a elektrony. Elektrony jsou použity na tvorbu organických látek z anorganických, kyslík je uvolněn jako odpadní produkt. Když začal být tento proces využíván živými organizmy, znamenalo to velkou změnu pro celou Zemi. Dalo by se to označit za „velký třesk“ ve vývoji biosféry. Život na této planetě už nebyl limitován zdroji sloučenin, které byly do té doby využívány jako donory vodíku a elektronů (organické kyseliny, Fe^{2+} , H_2S , NH_2). Voda, které bylo a stále je na Zemi prakticky nevyčerpatelné množství, byla pro živé organizmy zpřístupněna jako zdroj redukčních ekvivalentů potřebných k fixaci uhlíku, což umožnilo obrovský nárůst biomasy (Renger & Renger 2008; Williamson *et al.* 2011).

Uvolňování kyslíku jako odpadního produktu mělo také dalekosáhlé následky. Vedlo k vytvoření atmosféry s vysokým obsahem kyslíku, což značně změnilo směr evoluce. Anaerobní formy života, existující v té době existovaly, byly donuceny čelit zvyšujícímu se obsahu kyslíku – buď vyhynout, nebo se přizpůsobit. Přítomnost kyslíku však umožnila aerobní dýchání, při kterém je maximálně využita energie v organických látkách a je schopné zajistit energii pro komplexnější formy života. Navíc kyslík v atmosféře umožnil vznik ochranné ozónové vrstvy, která umožnila rozšíření života na souš (Renger & Renger 2008; Williamson *et al.* 2011).

Detailní porozumění mechanismu fotosyntetického štěpení vody není pouze lákavou výzvou pro základní výzkum. Očekává se, že poskytne inspiraci a znalosti pro vytvoření umělých zařízení sloužících k využívání sluneční energie lidmi.

Předkládaná práce je zaměřena na protein PsbO (mangan-stabilizující protein), který je vnější podjednotkou fotosystému II (PSII) nasedající na membránové podjednotky PSII z luminální strany. PsbO má zásadní vliv na rozklad vody a produkci kyslíku probíhající v PSII. Nachází se pravděpodobně ve všech fotosyntetizujících organizmech vyvíjejících kyslík (De Las Rivas *et al.* 2004). Jeho nezbytnost pro funkci PSII je možné demonstrovat i na zvláštním mořském zadožábrém plži *Elysia chlorotica*. Ten získává plastidy ze své potravy, řasy *Vaucheria litorea*, a ukládá je do svého trávicího epitelu, kde jsou schopny několik měsíců fotosyntetizovat a dodávat plži energii a fixovaný uhlík. Plastidy fungují i bez jaderného genomu řasy, což je zarážející, neboť většina proteinů v chloroplastech (včetně PsbO) je kódována v jaderném genomu – nemůže tedy probíhat normální obnova většiny chloroplastových proteinů. Bylo však prokázáno, že gen *psbO* má plž přítomný ve svém

jaderném genomu, pravděpodobně jako důsledek horizontálního genového přenosu (Rumpho *et al.* 2008).

Tato práce je zaměřena především na PsbO vyšších rostlin, a evoluci a funkční rozdíly mezi jeho izoformami, které jsou přítomné ve většině vyšších rostlin. Práce však zabíhá i k PsbO sinic a zelených řas, protože v některých ohledech výzkum prováděný na těchto organizmech dospěl dál.

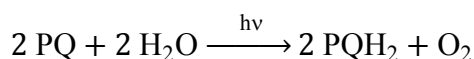
1.1 Cíle

- 1) Izolovat a sekvenovat genomové a cDNA verze genů kódujících PsbO v bramboru
- 2) Detailně porovnat proteinové spoty PsbO z bramboru na gelu z 2D IEF-SDS PAGE
- 3) Optimalizovat expresi *psbO* v *E. coli* a následnou purifikaci rekombinantního proteinu PsbO
- 4) Pomocí bioinformatických analýz odhalit zákonitosti evoluce izoform PsbO

2 Literární přehled

2.1 Fotosystém II

Fotosystém II (photosystem II, PSII) je membránový proteinový komplex nacházející se v tylakoidních membránách všech oxyfototrofních organismů¹, od sinic přes řasy po vyšší rostliny. Skládá se z mnoha proteinů a kofaktorů a katalyzuje jeden z nejdůležitějších kroků fotosyntézy, přenos elektronů z vody na plastochinon za využití energie ze světla. Jinými slovy je to oxidoreduktáza oxidující vodu a redukující plastochinon (Renger 2011):



"Zkonstruování" PSII přírodou před 2–3 miliardami let bylo bezpochyby jednou z nejdůležitějších událostí v historii života na Zemi se dvěma velmi důležitými souvislostmi – obrovská zásoba vody na zemském povrchu mohla být využita jako zdroj elektronů (vodíku) pro živé organismy a uvolňování kyslíku jako odpadního produktu vedlo ke vzniku aerobní atmosféry s obrovskými důsledky pro rozvoj života i geochemické procesy na Zemi (Renger & Renger 2008; Williamson *et al.* 2011).

V tylakoidních membránách se PSII vyskytuje v tzv. PSII-LHCII superkomplexech tvořených dimerem PSII a různým počtem světlosběrných komplexů II (light-harvesting complex II, LHCII) – antenních protein-pigmentových komplexů zajišťujících příjem světelné energie (Dekker & Boekema 2005).

2.1.1 Funkce fotosystému II

Absorbci světla v superkomplexu fotosystému zajišťují molekuly chlorofylu. Pokud chlorofyl absorbuje světlo, elektron z nejvyššího obsazeného orbitalu přeskočí do nejnižšího (absorpce červeného světla) nebo druhého nejnižšího (absorpce modrého světla) neobsazeného orbitalu. Při přeskoku do druhého excitovaného stavu po absorpci modrého světla dojde rychle ke ztrátě části energie a sestoupení do prvního excitovaného stavu (Cardona *et al.* 2012).

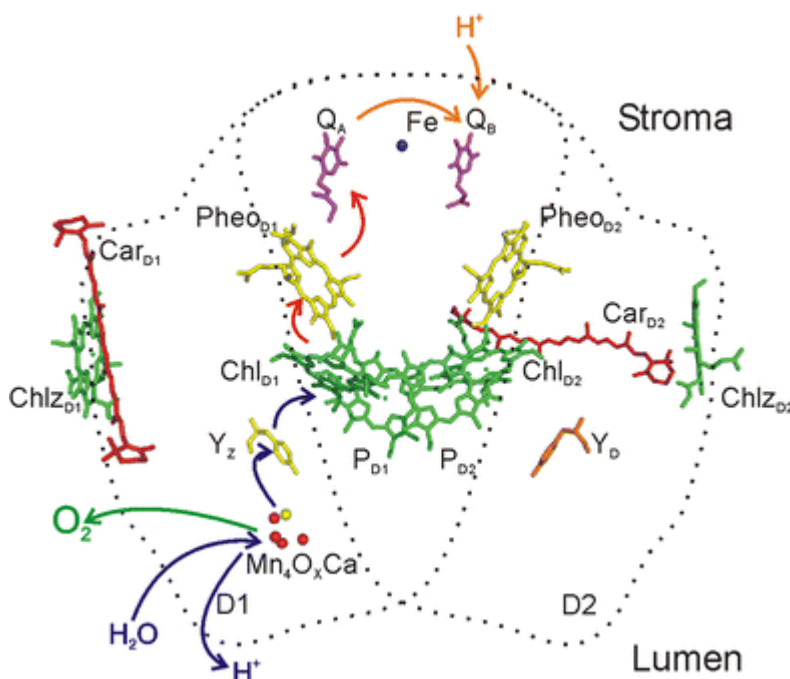
Většina chlorofylu je vázána v proteinech dvou typů – v proteinech jader fotosystémů a v antenních proteinech. Pokud je fotonem excitována molekula chlorofylu v antenním komplexu, je excitace rychle předána mezi sousedícími molekulami chlorofylu. Po dobu trvání excitace může excitovaný stav navštívit velké množství molekul chlorofylu. Pokud přejde na specifickou molekulu chlorofylu v reakčním centru fotosystému, označovanou jako

¹ Oxyfototrofné jsou organismy získávající energii ze světla prostřednictvím fotosyntézy, při které je rozkládána voda a produkován kyslík.

primární donor elektronu, nedojde k dalšímu přenosu excitovaného stavu, ale k uvolnění a přenosu elektronu – separaci náboje (Cardona *et al.* 2012).

Elektron je předán z primárního donoru (jeden z chlorofylů P_{D1} a P_{D2} , označovaných jako speciální pár) přes další molekulu chlorofylu (Chl_{D1}), molekulu feofytinu ($Pheo_{D1}$) a molekulu plastochinonu v Q_A místě na molekulu plastochinonu v Q_B místě. Plastochinon Q_B takto přijme postupně dva elektrony, zároveň přijme dva protony ze stromatu a takto redukovaný na plastochinol se uvolní z Q_B místa a difunduje membránou. Primární donor, jemuž chybí elektron, je velmi silným oxidačním činidlem, které se redukuje přijetím elektronu od tyrozinu (Y_Z), který je následně zpět redukován příjmem elektronu z kyslík-uvolňujícího centra (oxygen evolving center, OEC). OEC je takto postupně oxidováno, následkem čehož dochází k oxidaci dvou molekul vody, ze kterých se doplní chybějící elektrony. V jednom cyklu (tzv. Kokův cyklus) jsou s využitím energie 4 fotonů odvedeny elektrontransportním řetězcem 4 elektrony a do lumen tylakoidu jsou uvolněny 4 protony a jedna molekula kyslíku (Renger & Renger 2008; Cardona *et al.* 2012).

Funkce PSII je shrnuta na Obr. 2.1.



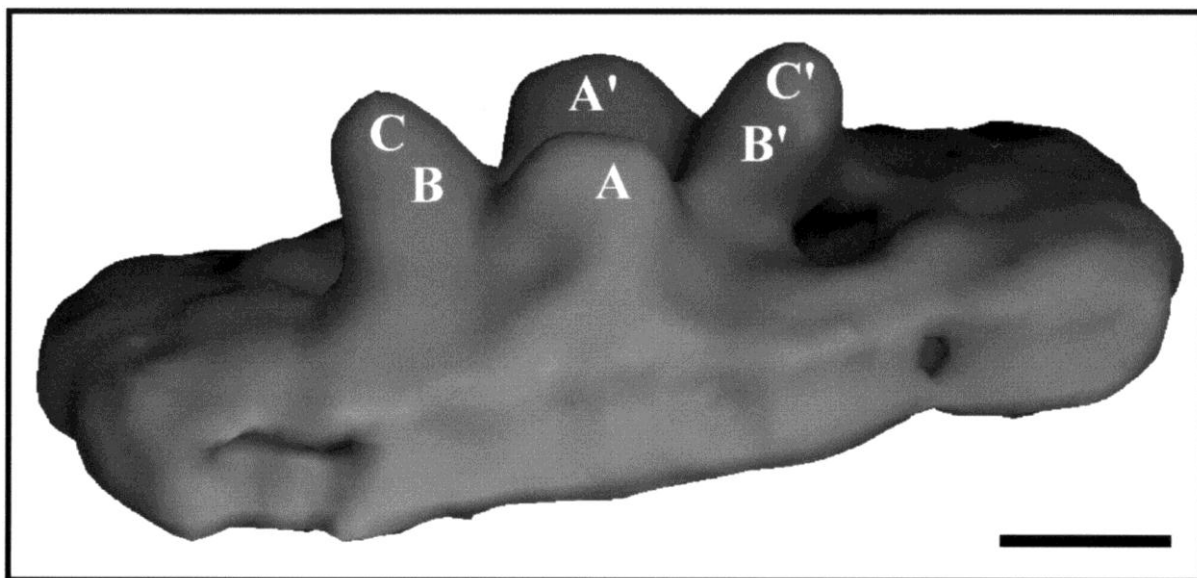
Obr. 2.1: Uspořádání kofaktorů v jádru PSII se znázorněním probíhajících reakcí. Pohled z roviny membrány. Chlorofyl je znázorněn zeleně, feofytin a Tyr_Z žlutě, plastochinon fialově, karotenoidy červeně. Atomy manganu jsou znázorněny jako červené kuličky, atom vápníku jako žlutá kulička, atom železa jako kulička fialová. Proteiny D1 a D2, vážící kofaktory, jsou znázorněny tečkovanými čarami. Převzato z Renger & Renger (2008).

2.1.2 Určování struktury fotosystému II

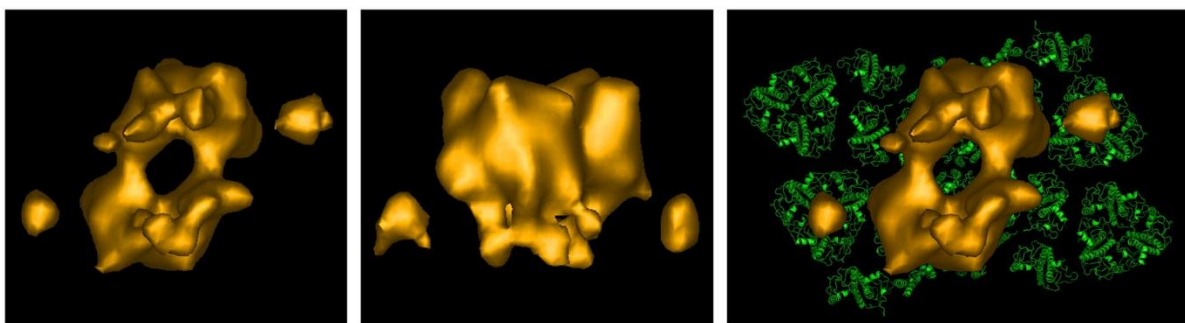
Během posledních jedenácti let bylo postupně publikováno několik struktur intaktního (schopného produkce kyslíku) PSII s rozlišením od 3,8 Å po 1,9 Å (Zouni *et al.* 2001; Kamiya & Shen 2003; Ferreira *et al.* 2004; Loll *et al.* 2005; Guskov *et al.* 2009; Umena *et al.*

2011). Všechny tyto strukturní analýzy byly však prováděny na PSII dvou blízce příbuzných termofilních sinic (*Thermosynechococcus elongatus* a *Thermosynechococcus vulcanus*). Nikomu se zatím nepodařilo získat krystaly eukaryotního PSII vhodné k rentgenové difrakci. Částečné informace o struktuře jsou získávány jinými metodami. Elektronovou krystalografií 2D krystalů se podařilo určit pozice hlavních podjednotek a umístění transmembránových helixů (Hankamer *et al.* 2001b). Porovnáním se strukturou PSII sinice bylo zjištěno, že umístění hlavních podjednotek si odpovídá, ovšem uspořádání menších (low molecular weight, LMW) podjednotek už tolik ne (Hankamer *et al.* 2001a). Navíc podrobné struktury PSII sinice obsahují pouze 20 proteinových podjednotek v jednom monomeru PSII, poslední (Umena *et al.* 2011) dokonce jen 19. Počet proteinových podjednotek PSII vyšších rostlin je daleko větší a v posledních letech jsou stále identifikovány další. V dnešní době je známo téměř 40 proteinů, které jsou více či méně pevně vázány na rostlinný fotosystém II (Shi *et al.* 2012).

Představa o struktuře celého superkomplexu PSII-LHCII vyšších rostlin byla získána pomocí jednočásticové analýzy (single particle analysis) elektronmikroskopických snímků. Třírozměrná struktura superkomplexu ze špenátu s rozlišením 17 Å byla získána jednočásticovou analýzou snímků z elektronové kryomikroskopie (Nield *et al.* 2002; Obr. 2.2). Dvourozměrná mapa superkomplexu huseníčku s rozlišením 12 Å byla získána obdobně jednočásticovou analýzou snímků z elektronové mikroskopie (Caffarri *et al.* 2009). 3D model superkomplexu ze špenátu i s částí granálních tylakoidních membrán byl nedávno získán pomocí kryoelektronové tomografie (Kouřil *et al.* 2011; Obr. 2.3).



Obr. 2.2: Šikmý pohled na povrch 3D modelu superkomplexu PSII-LHCII špenátu o rozlišení 17 Å získaný pomocí jednočásticové analýzy z fotografií z elektronového mikroskopu. Výběžky označené písmeny odpovídají vnějším proteinům OEC. Měřítka představuje 50 Å. Převzato z Nield *et al.* (2002).



Obr. 2.3: Model superkomplexu PSII-LHCII a jeho vnějších proteinů získaný kryoelektronovou tomografií. Pohled z lumina, podél tylakoidní membrány a z lumina na rekonstrukci celého superkomplexu včetně modelů membránových podjednotek. Převzato z Kouřil *et al.* (2011).

2.1.3 Membránové podjednotky fotosystému II

V centru každého monomeru PSII je heterodimer podjednotek D1 a D2. Tyto dvě podjednotky váží kofaktory zprostředkovávající světlem podmíněný transport elektronu (zobrazené na Obr. 2.1). D1 i D2 protein mají každý 5 transmembránových helixů. Jsou si strukturně podobné a v heterodimeru jsou uspořádané podle dvojčetné osy symetrie. Podle stejné osy symetrie jsou uspořádané i proteiny CP43 a CP47 (chlorophyll-binding protein), které jsou po stranách D1 a D2, a z nichž má každý 6 transmembránových helixů. Kolem této čtveřice hlavních podjednotek je větší množství transmembránových LMW podjednotek (Nield & Barber 2006; Umena *et al.* 2011).

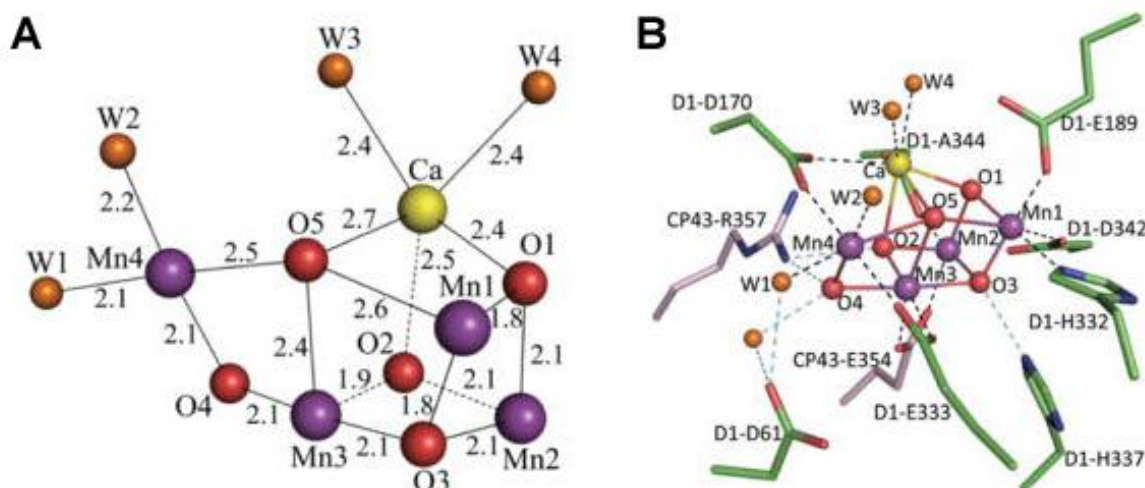
Membránové podjednotky PSII váží velké množství kofaktorů. Ve strukturách PSII termofilních sinic bylo v monomeru PSII nalezeno 35 molekul chlorofylu A, 2 molekuly feofytinu, 11 molekul β -karotenu, 2 molekuly plastochinonu, 2 hemy, 4 atomy manganu, 1 nehemový železnatý kationt a 1 hydrogenuhličitanový aniont (Loll *et al.* 2005; Umena *et al.* 2011). V nejpodrobnější publikované struktuře (Umena *et al.* 2011) byly kromě vápenatého kationtu, který je součástí Mn_4CaO_5 klastru v OEC, identifikovány ještě 2–3 další vápenaté kationty a 3 chloridové anionty (z nichž dva jsou poblíž Mn_4CaO_5 klastru).

2.1.4 Struktura a funkce kyslík-uvolňujícího centra (OEC)

Kyslík-uvolňující centrum (oxygen-evolving center, někdy označované také jako oxygen-evolving complex, water-oxidizing complex či water-splitting complex) je v PSII umístěno excentricky směrem k proteinu D1 poblíž roviny lumenálního povrchu tylakoidní membrány. Jedním z hlavních cílů zlepšování rozlišení u struktur PSII sinic získaných rentgenovou krystalografií bylo určit přesné pozice kofaktorů v OEC, což se poměrně dobře povedlo v poslední publikované struktuře (Umena *et al.* 2011). V OEC jsou 4 atomy manganu (s měnícími se oxidačními čísly) a jeden vápenatý kationt, které jsou propojené dohromady 5 atomy kyslíku sloužícími jako oxo-můstky. Tato struktura je označována jako Mn_4CaO_5 klastr. Atom vápníku, 3 atomy manganu a 4 atomy kyslíku tvoří strukturu podobnou krychli.

Zbylé dva atomy (mangan a kyslík) jsou umístěny poblíž, tvořící jakési "opěradlo" pomyslné "židle" (Obr. 2.4 A). S Mn_4CaO_5 klastrem jsou koordinovány také 4 molekuly vody, dvě s atomem manganu a dvě s atomem vápníku. Některé z nich pravděpodobně slouží jako substrát pro oxidaci. Jako ligandy Mn_4CaO_5 klastru slouží 8 postranních řetězců proteinu D1 a 2 proteinu CP43 (Obr. 2.4 B). Dva chloridové anionty v blízkosti Mn_4CaO_5 klastru mají pravděpodobně strukturní funkci a udržují ve správné konformaci části proteinů poskytující ligandy klastru (Umena *et al.* 2011).

Rozklad vody v OEC probíhá tzv. Kokovým cyklem. Při každém z přechodu mezi za sebou následujícími stavy S_0 až S_4 je elektrontransportním řetězcem odveden jeden elektron a postupně jsou uvolňovány i protony do lumen tylakoidu. Při přechodu ze stavu S_4 do stavu S_0 je uvolněna molekula kyslíku a navázány dvě molekuly vody. Přesný mechanismus reakcí však přes velké úsilí výzkumných skupin stále není jasný (Renger 2011). Novou naději na rozluštění struktury Mn_4CaO_5 klastru v jednotlivých stavech a tím i reakčního mechanismu skýtá nově vyvinutá technika femtosekundové rentgenové difrakce mikrokrytalů PSII při laboratorní teplotě (Kern *et al.* 2012).



Obr. 2.4: Struktura Mn_4CaO_5 klastru. A – uspořádání atomů a vzdálenosti mezi nimi (v angströmech), B – manganový klastr společně s jeho ligandy. Fialová – mangan, žlutá – vápník, červená – kyslík, oranžová – molekula vody, modrá – dusík, zelená – uhlík v proteinu D1, růžová – uhlík v proteinu CP43. Ligandy jsou označeny názvem proteinu, zkratkou aminokyseliny a jejím pořadím v proteinu. Převzato z Umena *et al.* (2011).

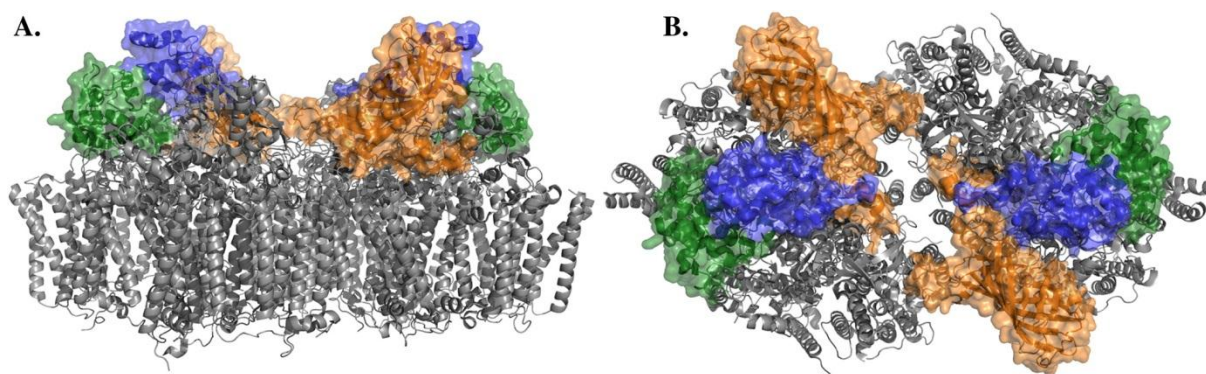
2.1.5 Vnější proteiny fotosystému II

Jako vnější proteiny (extrinsic proteins) PSII jsou označovány proteiny nasedající z lumenální strany na membránové podjednotky PSII (Roose *et al.* 2007; Bricker *et al.* 2012). Jejich složení se liší mezi různými evolučními skupinami. Hlavním vnějším proteinem, nejdůležitějším pro funkci PSII, je protein PsbO, označovaný také jako mangan-stabilizující protein (manganese-stabilizing protein, MSP) či dříve OEC 33 kDa subunit. Nachází se ve všech zkoumaných oxyfototrofních organismech (De Las Rivas *et al.* 2004). Ve vyšších

roślinach a zelených řasách jsou vedle PsbO mezi vnějšími proteiny PSII ještě proteiny PsbP, PsbQ a PsbR. Sinice mají na PSII relativně pevně vázány proteiny PsbU a PsbV (společně s PsbO jsou i na rentgenovou krystalografii určených strukturách, Obr. 2.5), méně pevně však s PSII asociují i homology PsbP a PsbQ, označované jako CyanoP a CyanoQ (De Las Rivas *et al.* 2004; Thornton *et al.* 2004; Roose *et al.* 2007; Bricker *et al.* 2012). Evolučně původnějších je tedy pravděpodobně 5 vnějších proteinů, z nichž dva (PsbU a PsbV) u zelených řas a vyšších rostlin vymizely. Za jakési konzervované mezistádium je možné považovat složení vnějších proteinů PSII ruduch. V ruduchách (konkrétně v řase *Cyanidium caldarium*) byly nalezeny vnější proteiny PsbO, PsbU, PsbV a PsbQ' – větší, 20kDa homolog CyanoQ (Ohta *et al.* 2003).

Geny kódující vnější proteiny PSII byly v průběhu evoluce postupně přesunuty z chloroplastů do jádra. Geny *psbO*, *psbP* a *psbQ* se u zelených řas a vyšších rostlin nacházejí v jaderném genomu. V ruduchách je protein PsbV kódován plastidovou DNA, zbylé vnější proteiny (PsbO, PsbU a PsbQ') jsou kódovány jaderným genomem (De Las Rivas *et al.* 2004).

Hlavní funkcí vnějších proteinů PSII je pravděpodobně stabilizovat a chránit OEC, což bylo dokázáno v mnoha experimentech (Bricker *et al.* 2012). V jejich nepřítomnosti je sice i PSII vyšších rostlin schopný produkce kyslíku, ovšem jen v podmínkách *in vitro* při zvýšených koncentracích Ca^{2+} a Cl^- a pouze v malé míře (přibližně 25 % produkce kyslíku v kontrole; Bricker 1992).



Obr. 2.5: Struktura dimeru fotosystému II sinice *Thermosynechococcus vulcanus* (Umena *et al.* 2011) se zvýrazněnými vnějšími proteiny. A – pohled z roviny membrány (stromatální strana je dole), B – pohled z lumina kolmo na rovinu membrány. Oranžová – PsbO, modrá – PsbU, zelená – PsbV, šedá – membránové podjednotky PSII. Převzato z Bricker *et al.* (2012).

2.1.5.1 Uspořádání vnější proteinů na fotosystému II

Způsob nasedání vnějších proteinů na PSII, ač studován v mnoha experimentech, není stále zcela jasný. Jednotlivé modely jsou opakovaně rozebírány v literatuře (Suorsa & Aro 2007; Bricker *et al.* 2012). Shodují se v tom, že PsbO se váže na PSII nezávisle na PsbP a PsbQ. PsbP a PsbQ lze z PSII odmyt 1M NaCl, zatímco PsbO zůstává na PSII navázaný i při 2M koncentraci NaCl (Ghanotakis *et al.* 1984). PsbO lze z PSII odmyt pomocí 1M CaCl_2

(Ono & Inoue 1983) nebo 2,6M močovinou s 200mM NaCl (Miyao & Murata 1984b). Modely pro vyšší rostliny se však rozcházejí v tom, zda se PsbP na PSII váže přes PsbO nebo nezávisle a zda PsbQ se váže samostatně, přes PsbO či přes PsbP. Na vazbě PsbP a PsbQ se zřejmě zásadním způsobem podílí i protein PsbR (Suorsa *et al.* 2006). Navrženy byly i modely, že vazba PsbO upravuje konformaci vnitřních podjednotek tak, aby se mohly vázat PsbP a PsbQ. U zelených řas bylo jasně prokázáno, že se PsbP a PsbQ mohou vázat na PSII nezávisle na PsbO (Suzuki *et al.* 2003). Lze předpokládat, že v evoluci nedošlo k zásadním změnám umístění vnějších proteinů. Je tedy pravděpodobné, že jednotlivé vnější proteiny interagují jak mezi sebou navzájem, tak s membránovými podjednotkami PSII, ovšem jednotlivé interakce mohou být u různých evolučních skupin různě silné.

Nield & Barber (2006) porovnávali strukturu dimeru PSII sinice (Ferreira *et al.* 2004) se strukturou superkomplexu PSII-LHCII špenátu o rozlišení 17 Å získanou jednočásticovou analýzou snímků z elektronové kryomikroskopie (Nield *et al.* 2002; Obr. 2.2). Ověřili, že v místě vazby PsbU a PsbV na PSII sinice není na PSII špenátu žádný protein. Do zbylého neobsazeného prostoru s vyšší elektronovou denzitou se pokusili domodelovat proteiny PsbP a PsbQ. Tento model však kritizovali (Caffarri *et al.* 2009), kteří ukázali, že PsbQ se na PSII váže nezávisle na PsbP, ale vazba obou těchto proteinů závisí na vazbě specifických světlosběrných komplexů k PSII.

2.1.6 Světlosběrné komplexy fotosystému II

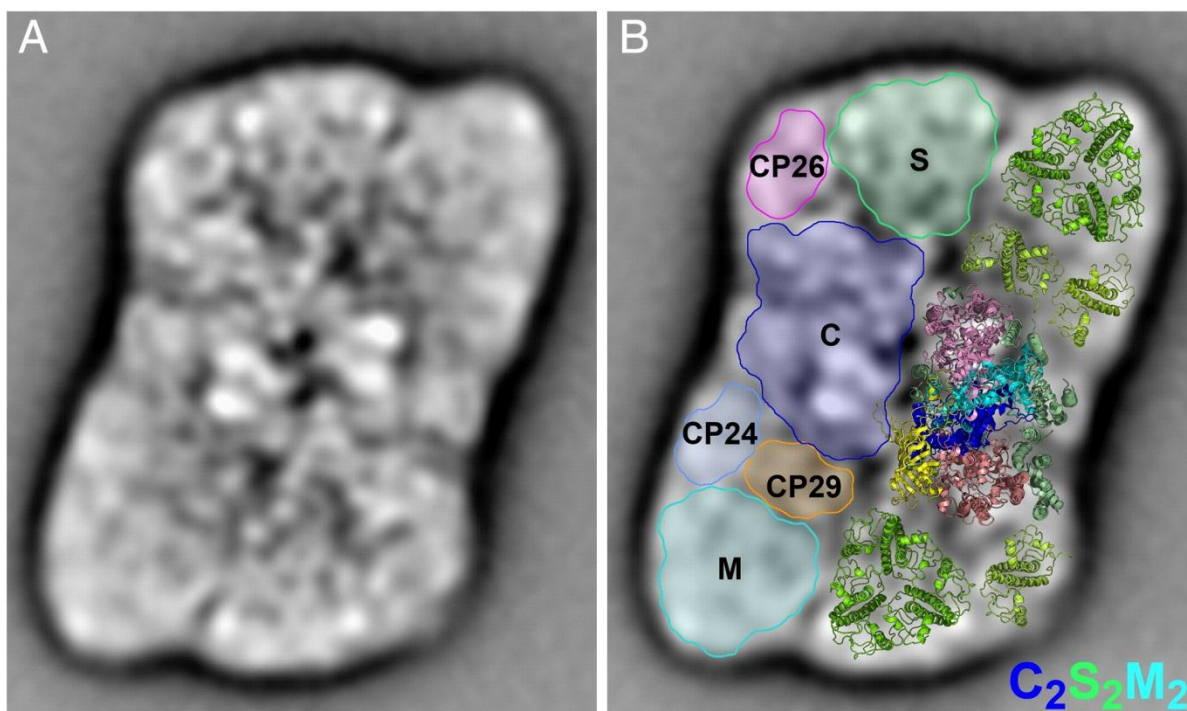
Světlosběrné komplexy PSII (light harvesting complex II, LHCII, také označované jako periferní antény či anténní komplexy) u vyšších rostlin sestávají z pigment-proteinových komplexů s proteinovými podjednotkami se třemi transmembránovými helixy patřícími do genové nadrodiny *Lhc* (Jansson 1999; Ballottari *et al.* 2012). Pigmentovou složku tvoří chlorofyl A i B, β -karoten a xantofyly – lutein, violaxantin, neoxantin a zeaxantin (Barros & Kühlbrandt 2009). Nejvíce se světlosběrné komplexy vyskytují v tzv. LHCII trimerech tvořených různými kombinacemi tří velmi podobných proteinů kódovaných geny *Lhcb1*, *Lhcb2* a *Lhcb3*. Kromě toho bývají s PSII asociovány také tři minoritní světlosběrné komplexy, které se obvykle vyskytují jako monomery označované CP29, CP26 a CP24. Kódovány jsou geny *Lhcb4*, *Lhcb5* a *Lhcb6* (Kouřil *et al.* 2012). Struktury LHCII trimerní (Obr. 2.7) a CP29 byly určeny pomocí rentgenové krystalografie (Liu *et al.* 2004; Standfuss *et al.* 2005; Pan *et al.* 2011).

Funkcí světlosběrných komplexů je absorbovat světlo a přenášet ho do jádra PSII. Kromě toho také hrají roli v regulaci poměru energie přenášené na PSII a na PSI (fotosystém I), organizaci tylakoidních membrán a ke kontrolované disipaci přijímané energie (přeměně na teplo) při nadměrném ozáření (Barros & Kühlbrandt 2009; Ballottari *et al.* 2012).

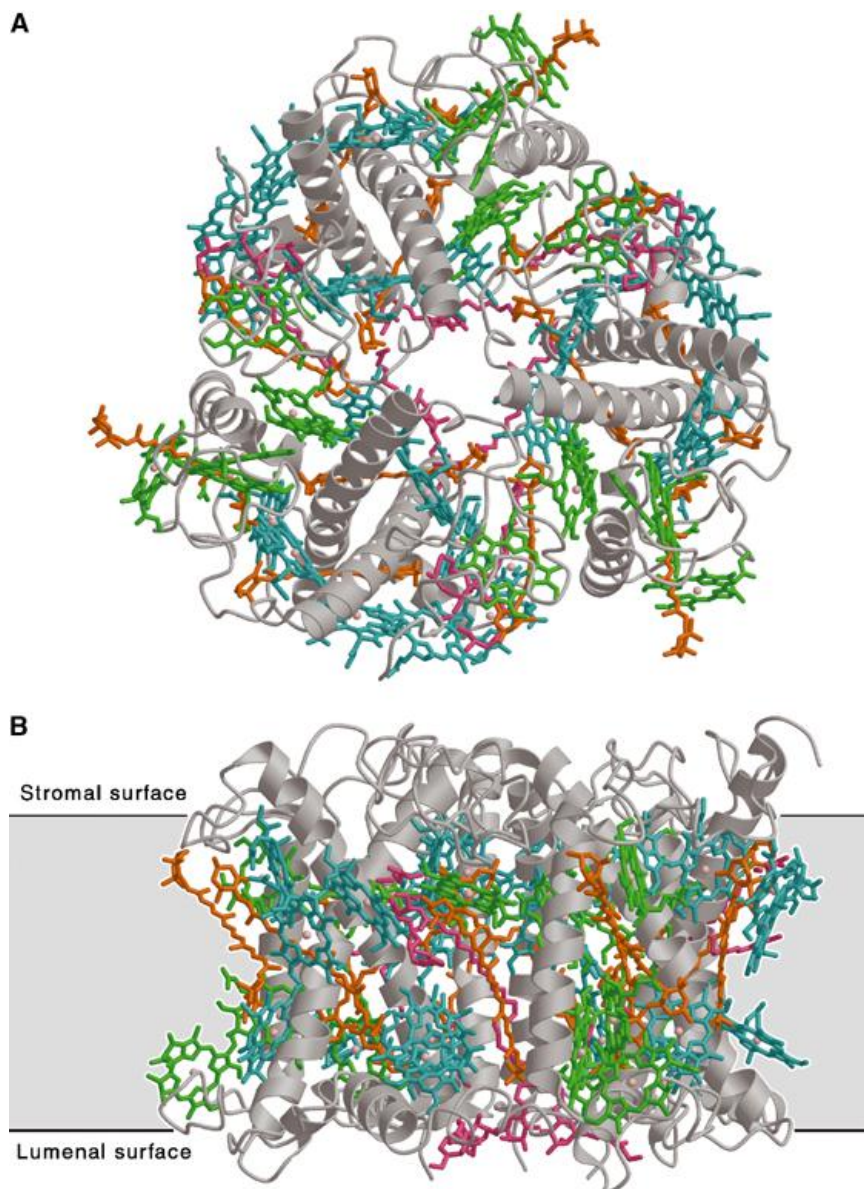
V tylakoidních membránách vyšších rostlin se vyskytuje velké množství různých variant superkomplexu PSII-LHCII. Dimer PSII může být obklopen různým množstvím různě uspořádaných trimerních i monomerních podjednotek LHCII. Předpokládá se, že se jedná o dynamický systém umožňující regulaci množství energie přijímané PSII (Caffarri *et al.* 2009; Kouřil *et al.* 2012). Jeden z typů superkomplexu PSII-LHCII, označovaný jako $C_2S_2M_2$, je ukázán na

Obr. 2.6.

Anténní komplexy sinic a ruduch, takzvané fykobilisomy, jsou značně odlišné od LHCII vyšších rostlin a zelených řas – netvoří je membránové proteiny, ale hydrofilní proteinové komplexy přiléhající k PSII z cytosolické/stromatální strany tylakoidní membrány. Tyto tzv. biliproteiny kovalentně váží chromofory biliny, například fykocyanobilin či fykoerythrobilin (Blankenship 2002). Vzhledem k nedávnému objevu, že vazba PsbP a PsbQ na PSII ve vyšších rostlinách souvisí s vazbou LHCII, je možné spekulovat, že ztráta PsbU s PsbV a důležitější role PsbP a PsbQ v zelených řasách a vyšších rostlinách souvisí s výměnou fykobilisomů za LHCII.



Obr. 2.6: Projekční mapa a model superkomplexu PSII-LHCII (typ $C_2S_2M_2$). A – projekční mapa s rozlišením 12 Å získaná jednočásticovou analýzou snímků z elektronové mikroskopie (Caffarri *et al.* 2009), B – proložení podrobných struktur dimeru PSII (Guskov *et al.* 2009) a proteinů Lhcb (Liu *et al.* 2004) s projekční mapou superkomplexu. Podrobné struktury: modrá – D1, modrozelená – D2, lososová – CP43, růžová – CP47, žlutá – PsbO, tmavě zelená – trimerní Lhcb, světle zelená – monomerní Lhcb. Komplexy: tmavě modrá (C) – monomer PSII, zelená – S-typ Lhcb trimerní, modrozelená – M-typ Lhcb trimerní, světle modrá – CP24, fialová – CP26, oranžová – CP29. Převzato z Kouřil *et al.* (2012).



Obr. 2.7: Model struktury trimerického světlosběrného komplexu fotosystému II hrachu (*Pisum sativum*). A – pohled ze stromatální strany, B – pohled z roviny membrány (luminální strana směřuje dolů). Modrozelená – chlorofyl A, zelená – chlorofyl B, oranžová – karotenoidy, fialová – lipidy. Převzato z Standfuss *et al.* (2005).

2.2 PsbO

2.2.1 Primární struktura PsbO

V eukaryotních organismech jsou podjednotky PSII kódovány jak v jaderné, tak v plastidové DNA. Ve vyšších rostlinách a zelených řasách se geny pro vnější proteiny PSII nacházejí v jaderném genomu. PsbO je tedy, stejně jako PsbP, PsbQ a PsbR, syntetizován na volných cytoplazmatických ribozomech. Transport do tylakoidů zajišťují dva N-koncové signální peptidy zařazené za sebou, první zajišťuje transport do stromatu chloroplastů, druhý do tylakoidů. Po transportu jsou signální peptidy odštěpeny peptidázou, čímž vzniká maturovaný protein (Seidler 1996).

Molekulová hmotnost maturovaného PsbO špenátu 26,53 kDa, určená z aminokyselinové sekvence, byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie. Z toho lze vyvodit, že PsbO nepodléhá rozsáhlejším posttranslačním modifikacím (Svensson *et al.* 2002). Původní označení „OEC 33 kDa subunit“ bylo chybně odvozeno na základě anomální pohyblivosti tohoto proteinu na denaturační proteinové elektroforéze (SDS-PAGE; Popelkova *et al.* 2003b).

De Las Rivas & Barber (2004) srovnáním všech tehdy známých sekvencí PsbO (od sinic přes zelené řasy až k vyšším rostlinám) zjistili, že pouze 19 aminokyselin je v sekvenci plně konzervovaných. Patří mezi ně i dva cysteiny, které spolu tvoří disulfidický můstek (viz dále). Většina se nachází v pěti konzervovaných oblastech, které v sekvenci autoři identifikovali. Ty, vedle oblasti zahrnující zmíněné cysteiny, zahrnují především oblasti zodpovědné za vazbu PsbO na PSII.

2.2.2 Sekundární a terciární struktura PsbO

Dosud se žádné výzkumné skupině nepodařilo získat krystaly samotného PsbO vhodné k rentgenové krystalografii. V roce 2000 byla publikována zpráva o získání mikrokrytalů PsbO špenátu (Anati & Adir 2000), další pokusy s krystalizací však pravděpodobně nebyly úspěšné. Proto představa o struktuře PsbO vychází především z krystalografických struktur celého PSII sinic (Loll *et al.* 2005; Guskov *et al.* 2009; Umena *et al.* 2011). Pomocí homologního modelování je možné úspěšně vytvořit model PsbO vyšších rostlin podle struktury PsbO sinice (De Las Rivas & Barber 2004). Ač Williamson (2008) upozorňuje, že některé charakteristiky PsbO sinic *Thermosynechococcus elongatus* a *Thermosynechococcus vulcanus* mohou být dané tím, že se jedná o termofilní organismy, lze předpokládat, že struktura PsbO vyšších rostlin nebude zásadně odlišná.

Hlavní část proteinu PsbO je tvořena β -soudkem složeným z 8 antiparalelních β -vláken. Vnitřek je vyplněný velkými hydrofobními postranními řetězci, což je typické pro jádro stabilních proteinů. Největším výstupkem z β -soudku, někdy označovaným jako „hlavová doména“, je $\beta 5$ - $\beta 6$ smyčka (řetězec spojující β -vlákna 5 a 6). Ta je tvořena neuspořádaným řetězcem a krátkým α -helixem. Dále z β -soudku vystupují $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčka a N-koncový řetězec (De Las Rivas & Barber 2004). N-koncový řetězec je pravděpodobně největší záhadou struktury PsbO vyšších rostlin, protože je o 13 aminokyselin delší než v určené struktuře PsbO sinice.

Další velkou odlišností PsbO sinic a vyšších rostlin je tzv. sinicová smyčka – $\beta 4$ - $\beta 5$ smyčka, prodloužená u sinic o 8 aminokyselin, vystupující z β -soudku v části odvrácené od PSII (De Las Rivas & Barber 2004).

Předpokládané struktury PsbO celkem dobře odpovídají i data o obsahu sekundárních struktur určené pomocí CD (circular dichroism) spektrometrie a FTIR (Fourier transform

infrared) spektrometrie. Popelkova *et al.* (2003b) a Williamson (2008) shrnují výsledky měření získané různými skupinami, které mají poměrně velký rozptyl. Všechny však naznačují, že pouze malá část proteinu je tvořena α -helixem, větší část β -listy a přibližně polovina řetězce je bez sekundární struktury. Výsledky pro PsbO vyšších rostlin a PsbO sinic se výrazně neliší.

S PSII interaguje PsbO především $\beta 5$ - $\beta 6$ smyčkou, kratšími smyčkami na tzv. spodní části β -soudku a částí N-koncového řetězce. Osa β -soudku svírá s rovinou tylakoidní membrány úhel přibližně 40° (De Las Rivas & Barber 2004).

2.2.3 Dynamika struktury PsbO

N-koncový řetězec je přidržován u β -soudku S-S můstkem mezi dvěma zcela konzervovanými cysteiny. Je-li tento disulfidický můstek redukován, má to velký dopad na strukturu proteinu. CD spektrum redukovaného PsbO odpovídá spektru PsbO denaturovaného (Tanaka *et al.* 1989; Nikitina *et al.* 2008). V *in vitro* podmínkách je však mutantní PsbO s cysteiny vyměněnými za alaniny schopný vazby na PSII a částečné funkce, i když jeho CD spektrum v roztoku také odpovídá denaturovanému proteinu (Betts *et al.* 1996; Wyman & Yocum 2005).

Více studií naznačuje, že volně v roztoku nemá PsbO zcela uspořádanou strukturu. Tato neuspořádanost však mizí při vazbě PsbO na PSII, který dává PsbO finální tvar (Popelkova *et al.* 2003b). Například propojovací činidlo EDC (*N*-ethyl-*N'*-(*N,N*-dimethyl-3-aminopropyl)karbodiimid) vytvářející kovalentní vazby mezi aminovou a karboxylovou skupinou v případě, že jsou ve vzdálenosti typické pro van der Waalsovy interakce, propojuje v rámci PsbO jiné aminokyseliny, pokud je navázaný na PSII a pokud je volně v roztoku (Enami *et al.* 1998). FTIR spektrometrie s použitím izotopového značení pro odlišení PsbO od zbylých proteinů zase ukázala, že po navázání na PSII asi 30–40 % řetězce projde změnou konformace, přičemž části bez sekundární struktury vytvoří β -vlákna (Hutchison *et al.* 1998).

Struktura PsbO se pravděpodobně mění i v závislosti na pH, a to i v rozsahu pH typickém pro lumen tylakoidu. Shutova *et al.* (2005) zjišťovali strukturní přestavby PsbO pomocí fluorescenční sondy ANS (1-anilinonaftalen-8-sulfonové kyseliny), která se váže na hydrofobní aminokyseliny. Zjistili, že při pH 5,7, předpovězeným pro lumen tylakoidu za světla, se sondy váže na PsbO více než při pH 7,2, předpovězeným pro tylakoidy ve tmě. Vyvodili z toho, že při nižším pH je přístupnější hydrofobní jádro PsbO, což souvisí se změnou konformace, která může být podstatná pro regulaci funkce za světla/tmy. Menší stabilita proteinů při pH blízkém jejich izoelektrickému bodu je běžná, to však neznamená, že to u PsbO nemůže mít funkční souvislosti.

Strukturní změny v okolí OEC v závislosti na pH, které mohou souviset se změnou struktury PsbO, pozorovali i Messinger & Renger (1994) a Kebekus *et al.* (1995).

PsbO je výjimečný svou termostabilitou. Lydakis-Simantiris *et al.* (1999) zjistili, že při zahřání na 90 °C PsbO špenátu sice ztrácí veškerou sekundární strukturu, po ochlazení se však dostává do téměř původního stavu a je schopný vazby na PSII, jehož aktivitu (produkci kyslíku) je schopen obnovit až z 80 % oproti vzorku se nezahřátým MSP.

2.2.4 Interakce s Ca^{2+}

Informace o interakci PSII či konkrétně vnějších proteinů s Ca^{2+} jsou v literatuře často nejasné, což částečně shrnují Miqyass *et al.* (2007). Je to pravděpodobně i z důvodu, že je v experimentech obtížné rozlišit mezi vápenatým kationtem vázaným v Mn_4CaO_5 klastru a vápenatými kationty vázanými na jiných místech na PsbO či poblíž něj, ať už specificky či nesespecificky.

Ädelroth *et al.* (1995) studovali interakce radioaktivního vápenatého kationtu ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) s PSII špenátu. Rychlost disociace Ca^{2+} z PSII stoupla po odstranění PsbP a PsbQ. Ještě více se zvětšila po odstranění PsbO. Odstranění vnějších proteinů tedy pravděpodobně vede k narušení vazebného místa pro vápenaté ionty nebo k odstranění bariéry, která brání rychlé výměně Ca^{2+} s okolním médiem.

Ghanotakis *et al.* (1984) také zjistili, že odstranění PsbP a PsbQ vede k částečné ztrátě Ca^{2+} kationtů. Naopak zvýšenou koncentrací Ca^{2+} může být kompenzována nepřítomnost PsbP a PsbQ (Ghanotakis *et al.* 1984).

Heredia & De Las Rivas (2003) a Kruk *et al.* (2003) navrhli, že vápenatý kationt je i součástí struktury PsbO. FTIR spektra ukázala, že přítomnost Ca^{2+} mění konformaci PsbO v roztoku na méně uspořádanou a snižuje jeho teplotní stabilitu (Heredia & De Las Rivas 2003). Kruk *et al.* (2003) identifikovali v PsbO jedno nízkoafinitní vazebné místo pro Ca^{2+} . Murray & Barber (2006) určili pravděpodobné vazebné místo ve struktuře PsbO *Thermosynechococcus elongatus* z anomálních difrakčních dat, která získali Ferreira *et al.* (2004). Stejně Ca^{2+} -vazebné místo identifikovali v své struktuře PsbO i Guskov *et al.* (2009). Aminokyseliny zapojené do tohoto vazebného místa však nejsou nijak výrazně konzervované (Murray & Barber 2006). Ve struktuře PsbO sinice *Thermosynechococcus vulcanus* (Umena *et al.* 2011) se toto vazebné místo nenachází, protože jedna ze tří vazebných aminokyselin má jinou konformaci (Bricker *et al.* 2012). Zato bylo v této struktuře identifikováno jiné Ca^{2+} -vazebné místo (Umena *et al.* 2011). Jednou z možností je, že Ca^{2+} je na PsbO vázán pouze nesespecificky jako artefakt krystalizace (Bricker *et al.* 2012). Pravděpodobnost nesespecifické vazby Ca^{2+} na PsbO je zvýšena i tím, že PsbO je kyselý protein ($\text{pI} = 5,2$) a při fyziologickém pH se tedy na povrchu proteinu vyskytuje negativní náboj (Popelkova *et al.* 2008).

Anati & Adir (2000) pozorovali, že PsbO může v roztoku tvořit dimery. Tvorba dimerů je podpořena zvýšením koncentrace PsbO nebo přidáním Ca^{2+} . Enami *et al.* (1998) prováděli

analýzu PsbO pomocí propojovacího činidla EDC. Použili velmi naředěné PsbO, aby předešli tvorbě nespecifických mezimolekulových propojení, přesto část PsbO vytvořila dimery, které byly konzervovány kovalentním propojením. Jak upozorňují Anati & Adir (2000), k izolaci PsbO byl v tomto případě použit 1M CaCl₂, který mohl podpořit tvorbu dimerů.

2.2.5 Interakce PsbO s fotosystémem II

Jak již bylo uvedeno, PsbO zůstává na PSII navázán i v přítomnosti 2M NaCl (Ghanotakis *et al.* 1984). K jeho uvolnění je potřeba 1M CaCl₂ (Ono & Inoue 1983). Vazba je tedy pravděpodobně zprostředkována relativně silnými iontovými interakcemi, které rozruší až dvoumocné kationty, v nichž je více koncentrovaný náboj (Bricker *et al.* 2012). Uvolnit PsbO z fotosystému je možné také 2,6M močovinou s 200mM NaCl (Miyao & Murata 1984b). V tomto případě se předpokládá, že močovina naruší dostatečně inter- či intramolekulární vodíkové můstky natolik, že je možné uvolnění PsbO 200mM NaCl – vodíkové můstky pravděpodobně ve vazbě hrají také roli (Bricker *et al.* 2012).

PsbO se váže na membránové podjednotky D1, D2, CP43 a CP47. Podrobně jednotlivé vazebné interakce v sinici rozebírají De Las Rivas & Barber (2004) a Bricker *et al.* (2012), Williamson (2008) je dokonce porovnává se studiemi používajícími mutantní PsbO (jak u sinic, tak u vyšších rostlin).

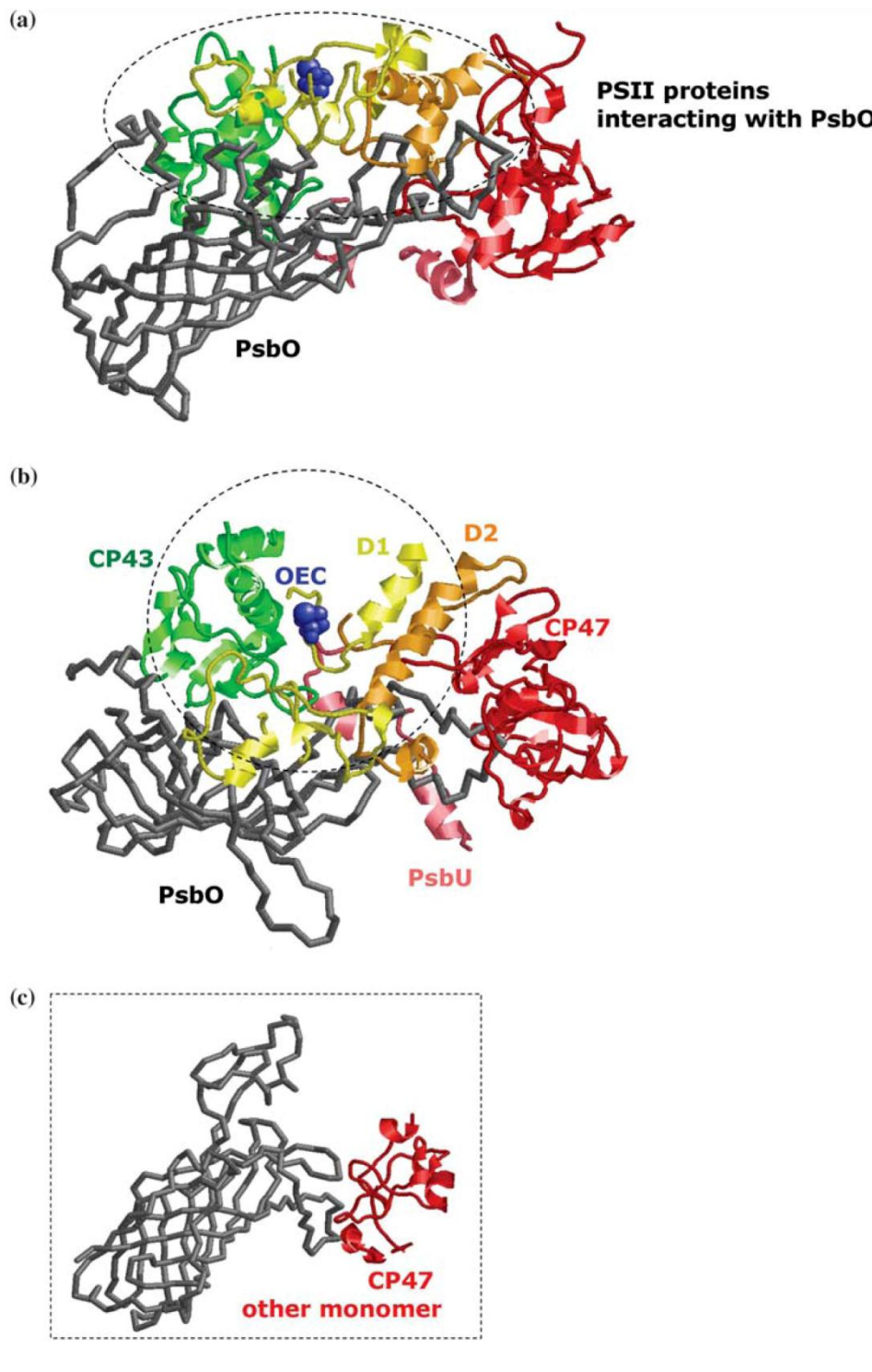
PsbO s PSII interaguje především rozsáhlou β5-β6 smyčkou a přilehlou „spodní“ částí β-soudku a krátkými smyčkami, které se v této části nacházejí. Část vazby je zprostředkována také částí N-koncového řetězce (De Las Rivas & Barber 2004).

Nejvíce vazebných interakcí má PsbO s proteiny CP43 a D1. Mezi místy, kde s nimi PsbO interaguje, se nachází mírně zanořený Mn₄CaO₅ klastr. C-koncový vnější helix proteinu D2 je rovněž v blízkosti Mn₄CaO₅ klastru a PsbO s ním tvoří minimálně dva vodíkové můstky (De Las Rivas & Barber 2004).

Pokud jsou aminokyseliny identifikované ze struktury PSII sinice jako potřebné pro vazbu mutovány (např. postranní řetězec s negativním nábojem vyměněn za řetězec s pozitivním nábojem), obvykle to sníží nebo úplně zruší schopnost PsbO vázat se na PSII, což platí i pro odpovídající aminokyseliny vyšších rostlin (Popelkova *et al.* 2003b; Williamson 2008; Bricker *et al.* 2012). Schopnost vazby na PSII narušují i některé mutace v místech, které nejsou ve struktuře PsbO blízko míst vazby (Williamson 2008). Například dvouaminokyselinové zkrácení C-konce, který se nachází v části odvrácené od PSII, mělo u PsbO huseníčku za následek neschopnost vazby na PSII (Betts *et al.* 1998). Předpokládá se, že podobné mutace způsobují rozsáhlejší změny struktury, a tím ovlivňují vazbu (Williamson 2008).

PsbO sinic interaguje i s proteinem CP47 z druhého PSII v rámci dimeru PSII, a to svojí β1-β2 smyčkou. Je pravděpodobné, že tím dimer stabilizuje (De Las Rivas & Barber 2004).

Jednotlivé oblasti, kterými se PsbO účastní vazby na PSII, si poměrně dobře odpovídají s konzervovanými oblastmi, které byly identifikovány v PsbO od sinic přes zelené řasy po vyšší rostliny. Méně konzervovaná než ostatní je oblast $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčky, která zprostředkovává interakci s druhým monomerním PSII (De Las Rivas & Barber 2004).



Obr. 2.8: Umístění PsbO sinice *Thermosynechococcus elongatus* vůči podjednotkám fotosystému II, se kterými interaguje.(a) Pohled podél povrchu membrány, (b) pohled přibližně kolmo na povrch membrány, (c) interakce s proteinem CP47 z druhého monomeru fotosystému II. Šedá – PsbO, žlutá – D1, oranžová – D2, zelená – CP43, červená – CP47, růžová – PsbU. Převzato z De Las Rivas & Barber (2004).

2.2.6 Stechiometrie vazby PsbO na fotosystém II

V krystalografických strukturách PSII sinic je přítomný pouze protein PsbO na monomeru PSII. Stále panují dohady o tom, zda tomu tak je i u vyšších rostlin, protože mnohé experimenty naznačují, že ve vyšších rostlinách a pravděpodobně i v zelených řasách jsou na jednom PSII vázány dva PsbO. Důkazy pocházejí ze tří druhů experimentů: kvantifikace proteinů, studie navazování PsbO na PSII a charakterizace mutantů (Popelkova *et al.* 2008; Bricker *et al.* 2012).

Yamamoto *et al.* (1987) vyizolovali z tylakoidních membrán špenátu, na kterých byly pouze pevně vázané proteiny, 1,7 molu PsbO na mol PSII. Dá se očekávat, že při izolaci došlo k částečné ztrátě proteinu (Popelkova & Yocum 2011). Přímá kvantifikace pomocí protilátek poskytla výsledek 2 moly PsbO na mol PSII (Xu & Bricker 1992).

Při experimentech se zpětným navazováním PsbO, které shrnují Popelkova & Yocum (2011) a Bricker *et al.* (2012), se ukázalo, že PSII se saturuje pomocí PsbO při navázání dvou molů na mol PSII. Navíc byla při vazbě pozorována kooperativita, pro kterou jsou třeba minimálně dvě podjednotky vázající se na stejný komplex. Předpokládá se tedy, že vazba jednoho PsbO zvyšuje afinitu pro vazbu druhého.

Analýza mutantních PsbO s různě zkráceným N-koncem odhalila dvě vazebné domény, které musejí být přítomny pro normální stochiometrii vazby (Popelkova *et al.* 2002, 2003a). Jedna z těchto domén není konzervovaná v sinicích, což může částečně vysvětlit nepřítomnost druhého PsbO na monomeru PSII u sinic.

Pro každou ze dvou kopií PsbO vázaných na PSII je navrhována trochu odlišná úloha. Předpokládá se, že první vázaný PsbO stabilizuje Mn_4CaO_5 klastr a snižuje nároky OEC na koncentraci Cl^- , druhý PsbO pravděpodobně dále snižuje nároky na koncentraci Cl^- a maximalizuje schopnost produkce kyslíku (Popelkova *et al.* 2008; Roose *et al.* 2011).

Bricker *et al.* (2012) také zmiňují více podivných výsledků z experimentů s propojovacími činidly, které by mohly být vysvětleny tak, že šlo o druhou kopii PsbO.

Otázkou zůstává, kde je u vyšších rostlin případná druhá kopie PsbO vázána. Bricker *et al.* (2012) navrhuje dvě možnosti. První možností je vazba druhé kopie symetricky k první podle stejné dvojčetné rotační symetrie, podle které jsou uspořádané podjednotky D1 s D2 a CP43 s CP47. Stejně jako první kopie "sedí" především na CP43 a D1, druhá kopie by interagovala především s CP47 a D2, což by mělo za následek, že by byla poměrně vzdálená od Mn_4CaO_5 klastru. Druhou možností je, že dvě kopie PsbO vytvářejí homodimer. Tuto hypotézu podporuje více okolností: Tvorba dimerů PsbO v roztoku byla již několikrát pozorována (Enami *et al.* 1998; Anati & Adir 2000; viz kap. 2.4.4 Interakce s Ca^{2+}). Z 3D modelu superkomplexu PSII-LHCII, získaného jednočásticovou analýzou elektronmikroskopických snímků, bylo odhadnuto, že PsbO může být přítomný jako dimer

(Boekema *et al.* 2000). Dále, Frankel & Bricker (1995) zjišťovali oblasti PsbO interagující s PSII pomocí porovnávání oblastí chemicky modifikovaných na PsbO v roztoku a na PsbO vázaném na PSII. Tímto způsobem byly určeny jako skryté při vazbě i některé oblasti, které by podle struktury PSII sinice měly být vystavené roztoku (Bricker *et al.* 2012).

2.2.7 Funkce PsbO

2.2.7.1 Důsledky inaktivace genu psbO

Sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 s inaktivovaným genem *psbO* je schopná sestavovat PSII a fotoautotrofně růst na plném médiu. Oproti nemutované kontrole však roste pomaleji, produkuje méně kyslíku (asi 40 % oproti kontrole) a je náchylnější k fotoinhibici. Není schopná růst při sníženém množství vápenatých a chloridových iontů (Burnap & Sherman 1991).

Pro fotoautotrofní růst zelených řas a vyšších rostlin je PsbO naprosto nezbytný. Jednobuněčná zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* nesoucí $\Delta psbO$ mutaci nebyla vůbec schopná sestavovat PSII (Mayfield *et al.* 1987). Obdobný fenotyp byl pozorován i u huseníčku, v kterém byla exprese obou izoforem PsbO umlčena pomocí RNA interference (Yi *et al.* 2005).

2.2.7.2 Stabilizace Mn_4CaO_5 klastru

Jak vyplývá z dříve používaného názvu pro PsbO (mangan-stabilizující protein), hlavní funkcí PsbO je stabilizovat Mn_4CaO_5 klastr. Ač byly aspekty této funkce zkoumány v mnoha experimentech, stále není mechanismus stabilizace zcela jasný.

Odstranění PsbO za fyziologických koncentrací Ca^{2+} a Cl^- vede k destabilizaci klastru, dva atomy manganu jsou redukovány a postupně ztraceny do roztoku (Miyao & Murata 1984a; Mavankal *et al.* 1986). V přítomnosti vysokých koncentrací Cl^- (větších než 100 mM) zůstane Mn_4CaO_5 klastr zachován a PSII je schopný produkce kyslíku, i když ve snížené míře (20–40 % oproti kontrole; Bricker 1992). Ze struktury PSII sinice (Umena *et al.* 2011), která obsahuje v okolí Mn_4CaO_5 klastru dvě vazebná místa pro Cl^- , se dá vyvodit, že PsbO pravděpodobně zajišťuje správnou konformaci vazebných míst pro Cl^- , které jsou potřeba pro správnou funkci OEC (Bricker *et al.* 2012).

Vztah PsbO a Ca^{2+} je méně jasný, ale zdá se, že PsbO svou vazbou zabraňuje Ca^{2+} v opuštění PSII, popřípadě svou vazbou zajišťuje správnou konformaci vazebného místa pro Ca^{2+} , ať už jde o vazebné místo v Mn_4CaO_5 klastru, nebo nějaké jiné (Ädelroth *et al.* 1995; Popelkova & Yocum 2011; Bricker *et al.* 2012).

2.2.7.3 Tvorba kanálu pro vodu, protony a kyslík

Jednou z rolí, kterými PsbO zajišťuje správnou funkci OEC, je pravděpodobně také podíl na tvorbě kanálů mezi luminem thylakoidu a Mn_4CaO_5 klastrem. Takový kanál, nacházející se pravděpodobně mezi PsbO a membránovými podjednotkami PSII, by mohl zajišťovat kontrolovaný vstup substrátové vody k Mn_4CaO_5 klastru, regulovat přístup různých dalších malých molekul a zajišťovat odvod produktů – protonů a kyslíku, aby bylo zabráněno nechtěným vedlejším reakcím (Hillier *et al.* 2001; De Las Rivas & Barber 2004; Shutova *et al.* 2007). Hillier *et al.* (2001) zjistili, že odstraněním vnějších proteinů z PSII se zpomalí výměna vody v OEC.

Několik skupin se pokusilo identifikovat případné kanály ve struktuře PSII sinice (Shutova *et al.* 2007; Murray & Barber 2007; Ho & Styring 2008; Gabdulkhakov *et al.* 2009). Jejich výsledky se bohužel do určité míry rozcházejí. Shutova *et al.* (2007) identifikovali v PsbO soubor karboxylových skupin, která by mohla být součástí hydrofilního kanálu schopného rychle odebírat a delokalizovat protony uvolňované při oxidaci vody. Změny konformace PsbO závislé na jeho protonaci by podle nich mohly hrát roli v regulaci transportu vody do OEC a protonů zpět.

Nejnovější studii kanálů pro substrát a produkty OEC publikovali Gabdulkhakov *et al.* (2009). Ve struktuře PSII s rozlišením 2,9 Å (Guskov *et al.* 2009) identifikovali 9 potenciální kanálů. Ze svého modelu usuzují, že produkty rozkladu vody (kyslík, protony a elektrony) jsou ihned po svém vzniku prostorově odděleny a každý putuje na jinou stranu od Mn_4CaO_5 klastru. Také zjistili, že jeden z předpokládaných kanálů je blokován vázaným chloridovým aniontem, pro který navrhli dvě různé funkce: Cl^- může ovlivňovat disociační konstanty okolních protonovatelných skupin a upravovat je pro efektivní přenos protonů z OEC, nebo může blokováním kanálu zabránit úniku vody z OEC či přístupu k němu ze špatné strany a zároveň stabilizovat řetězce molekul vody potřebné pro přenos protonů.

Jak však poznamenávají Williamson (2008) i Gabdulkhakov *et al.* (2009), je otázkou, do jaké míry je možné ze statické struktury sinice předpovědět skutečné kanály v komplexu, který je za běžných podmínek dynamický a navíc může měnit svou konformaci i v průběhu reakčního cyklu oxidace vody.

2.2.7.4 GTPázová aktivita PsbO

Ač se dříve myslelo, že se uvnitř tylakoidů nenacházejí nukleotidy, Spetea *et al.* (2004) předvedli několik důkazů, že v tylakoidech se nukleotidy vyskytují a probíhají tam na nukleotidech závislé procesy. Jedním z dobře doložených důkazů bylo, že PsbO váže GTP.

Lundin *et al.* (2007b) spektroskopickými metodami zjistili, že PsbO špenátu částečně mění konformaci po navázání GTP. Má slabou GTPázovou aktivitu, která se však 15x zvýší, pokud je PsbO navázán na PSII. Jak poznamenávají Bricker & Frankel (2011), je to zajímavé

v souvislosti, že afinitu ke GTP má PsbO vyšší v roztoku než navázaný na PSII (Spetea *et al.* 2004). Souvisí to pravděpodobně s pozorováním, že GTP stimuluje uvolnění PsbO z PSII a s hypotézou, že toto uvolnění souvisí s výměnou poškozeného proteinu D1 za podmínek fotoinhibice (Lundin *et al.* 2007b), viz dále.

Lundin *et al.* (2007b) navrhli umístění GTP-vazebného místa v modelu struktury PsbO špenátu. Predikované aminokyseliny zapojené do vazby nejsou konzervované v zelených řasách a sinicích, což souvisí s pozorováním, že PsbO těchto skupin GTP neváže. Ze svého modelu také usuzují, že hydrolyza GTP by mohla mít za následek změnu konformace β 1- β 2 smyčky, která interaguje s proteinem CP47 z druhého monomeru PSII. Změna konformace by tedy mohla mít za následek monomerizaci PSII, popřípadě i odpoutání PsbO z PSII (Lundin *et al.* 2007b).

2.2.7.5 Funkce PsbO v recyklaci proteinu D1

Během fotosyntézy dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, zvláště za podmínek nadměrného ozáření. Tyto silné oxidanty poškozují různé části PSII, především pak protein D1, což je nejčastější příčinou fotoinhibice. Aby se PSII s poškozeným proteinem D1 v tylakoidních membránách neakumulovaly, vyvinul se v rostlinách opravný cyklus. Ten zahrnuje fosforylaci některých podjednotek PSII, monomerizaci PSII a migraci z granálních do stromatálních částí tylakoidní membrány, částečné rozebrání jádra PSII, proteolýzu poškozených podjednotek, nahrazení nově nasyntetizovanými, opětovné sestavení, dimerizaci a aktivaci PSII (Aro *et al.* 2005; Tikkanen & Aro 2012). Pokud při tomto procesu není přítomný PsbO, D1 není degradován a tvoří agregáty s CP43 a CP47 (Yamamoto *et al.* 1998). Proto Yamamoto *et al.* (1998) navrhli hypotézu, že by PsbO mohl fungovat jako jakýsi chaperon zabráňující agregaci D1 a tím umožňující jeho degradaci.

Bylo zjištěno, že ve špenátu je k degradaci poškozeného D1 potřeba mimo jiné GTP (Spetea *et al.* 1999). Je tedy možné, že s cyklem výměny D1 souvisí GTPázová aktivita PsbO, která by mohla ovlivňovat i monomerizaci PSII (Lundin *et al.* 2007b).

Lundin *et al.* (2007a) pozorovali i vliv PsbO na defosforylaci proteinu D1 nutnou k jeho degradaci, molekulární mechanismus, který by to mohl zprostředkovávat, však není známý.

2.2.7.6 Vliv PsbO na strukturu superkomplexu PSII-LHCII

Jak již bylo zmíněno, minimálně u sinic PsbO interaguje s proteinem CP47 druhého monomeru PSII a tím možná stabilizuje dimer PSII (De Las Rivas & Barber 2004). Kromě toho také "vyčnívá" přes okraj PSII v místě, kde je u vyšších rostlin vázán LHCII trimer (Dekker & Boekema 2005;

Obr. 2.6). Boekema *et al.* (2000) zjistili z elektronmikroskopických snímků superkomplexů PSII-LHCII, že po odstranění PsbO je opravdu destabilizována interakce mezi

monomery PSII. Kromě toho se struktura superkomplexu znatelně mění, nejvíce změny svou pozici LHCI trimer vázaný přímo vedle PSII (označovaný písmenem S).

2.2.7.7 Úloha vnějších proteinů ve tvorbě gran

Již vícekrát byla navržena hypotéza, že vnější proteiny PSII jsou zapojeny ve štosování² (stacking) tylakoidních membrán a tvorbě gran (De Las Rivas *et al.* 2007; Suorsa & Aro 2007). K této hypotéze vede více informací: V granálních tylakoidních membránách s úzkým luminálním prostorem jsou umístěny především PSII-LHCI komplexy, zatímco fotosystém I a ATP syntáza se nacházejí ve stromatálních tylakoidních membránách. Cytochromový komplex se nachází přibližně ve stejném množství ve všech částech tylakoidní membrány (Dekker & Boekema 2005). Vzdálenost mezi středy dvou luminálních částí (oddělených dvěma membránami) se v granech na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie pohybuje přibližně od 14 do 24 nm (Dekker & Boekema 2005), což je vzdálenost vhodná k interakci vzhledem k velikosti výstupků pozorovaných na PSII (Nield *et al.* 2002). V případě vzdáleností blízkých se 14 nm se předpokládá, že dokonce PSII z prostorových důvodů nemohou být přímo proti sobě (Dekker & Boekema 2005; Kouřil *et al.* 2012). Interakce luminálních stran tylakoidních membrán byla prokázána také na váčcích vytvořených z těchto membrán otočených „naruby“ (Albertsson 1982). Proteiny PsbP a PsbQ pravděpodobně ve vyšších rostlinách asociují s PSII pouze v granech (Hashimoto *et al.* 1997).

V zelených řasách lze nalézt spíše jen náznaky štosování tylakoidů. Grana se však nacházejí v chloroplastech všech vyšších rostlin (Chow *et al.* 2005; Anderson *et al.* 2008). De Las Rivas *et al.* (2007) našli v proteinu PsbQ oblast specifickou pro vyšší rostliny, a proto předpověděli, že ve štosování tylakoidů by mohl hrát roli především tento protein. Pokusy s umlčováním tvorby proteinů PsbP a PsbQ však ukázaly, že na správné štosování tylakoidních membrán do gran nemá vliv snížení množství proteinu PsbQ pod 5 % normálních hodnot. Normálnímu štosování však brání snížení množství proteinu PsbP pod 13 % normálních hodnot. Je ale nutno zmínit, že snížení množství PsbP pod 13 % normálních hodnot mělo za následek úplnou ztrátu PsbQ z tylakoidů (Yi *et al.* 2009; Bricker & Frankel 2011).

Argumentem proti hypotéze zapojení vnějších proteinů PSII do tvorby gran je skutečnost, že synchronizované postavení komplexů PSII-LHCI bylo pozorováno pouze u membrán sousedících přes stromatální mezeru, ne u membrán sousedících přes luminální mezeru (Daum *et al.* 2010).

² Jako překlad anglického výrazu "stacking" bylo v této práci použito českého výrazu "štosování". Mohou sice nastat pochybnosti, zda tento výraz náleží do spisovného českého jazyka, avšak jedná se o běžně používané slovo a pravděpodobně nejvýstižnější překlad anglického termínu.

2.2.8 Izoformy PsbO a jejich specifické funkce

Sekvenování genomu huseníčku (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) odhalilo přítomnost dvou genů kódujících PsbO, *psbO1* (At5g66570) a *psbO2* (At3g50820). Proteomické analýzy lumina tylakoidů potvrdily přítomnost dvou izoform PsbO s mírně odlišnou elektroforetickou mobilitou (Schubert *et al.* 2002). Maturované izoformy PsbO1 a PsbO2, vzniklé expresí těchto genů, se liší pouze v 11 aminokyselinách. Predikce struktury pomocí homologního modelování podle struktury PsbO sinice jsou velmi podobné (Murakami *et al.* 2005).

PsbO1 je v huseníčku daleko více než PsbO2, tvoří asi 90 % PsbO v tylakoidech (Murakami *et al.* 2005). Jejich poměr se významně nemění v průběhu vývoje rostlin ani při různých formách stresu (Lundin *et al.* 2008). V tylakoidech adaptovaných na světlo a na tmu rozdíly také nebyly nalezeny, obě izoformy jsou přítomny stále ve stejném množství (Granlund *et al.* 2009). Až při dlouhodobém chladovém stresu (čtyřicetidenní kultivace při 5 °C) byl pozorován nárůst množství PsbO2 a pokles množství PsbO1 (Goulas *et al.* 2006). Na tomto místě je třeba zmínit, že chladový stres rostliny vnímají i jako nadměrné ozáření.

V *in vitro* experimentech se zpětným navazováním bylo zjištěno, že afinita k PSII je u obou izoform stejná. Produkce kyslíku je však za stejných podmínek vyšší při navázání PsbO1 na PSII – PsbO2 dosahuje přibližně 75 % hodnot PsbO1 (Murakami *et al.* 2005).

Je zjevné, že pro správnou funkci fotosyntetického aparátu huseníčku jsou potřebné obě izoformy PsbO. Oba mutanti s chybějící jednou nebo druhou izoformou vykazují jasné změny fenotypu (Obr. 2.9).

Mutant *psbo1* (postrádá izoformu PsbO1) vykazuje oproti nemutovaným rostlinám zpomalený růst, bledě zelené listy, zvýšenou náchylnost k fotoinhibici při krátkodobém nadměrném ozáření a častější výměnu proteinu D1 (Murakami *et al.* 2005; Lundin *et al.* 2007a).

Mutant *psbo2* roste pomaleji než nemutované rostliny, ale rychleji než mutant *psbo1*. Listy má tmavě zelené. Oproti nemutovaným rostlinám a *psbo1* se mu daří hůře při dlouhodobém stresu z nadměrného ozáření. Po vystavení jeho izolovaných tylakoidů nadměrnému ozáření u něj nedochází k degradaci proteinu D1, na rozdíl od tylakoidů z nemutovaných rostlin a mutanta *psbo1*. Bylo zjištěno, že u něj nedochází k defosforylaci proteinu D1 potřebné k indukci jeho výměny při poškození. Mutant *psbo1* měl naopak protein D1 fosforylovaný méně než nemutované rostliny (Lundin *et al.* 2007a).

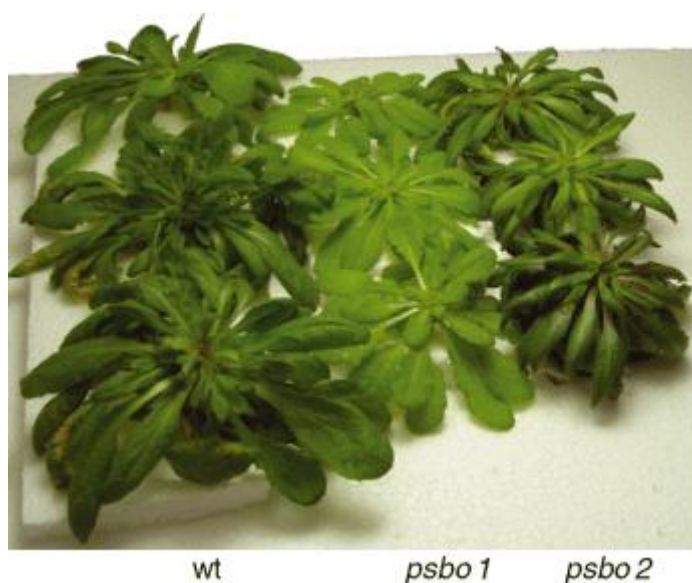
Exprese izoform je vzájemně kontrolována, v obou mutantech došlo k navýšení množství zbylé izoformy (Murakami *et al.* 2005; Lundin *et al.* 2007a, 2008).

Lundin *et al.* (2008) zjistili, že PsbO2 má 3x vyšší GTPázovou aktivitu než PsbO1. Z jejich výsledků také vyplývá, že oproti nemutovaným rostlinám má mutant *psbo1* za

normálního osvětlení zvýšený poměr PSII v monomerní formě vůči PSII v dimerické formě. Při nadměrném ozáření vykazovali tuto charakteristiku oba mutanti.

Podle Bricker & Frankel (2008) není PsbO2 schopný dostatečně efektivně zadržovat vápenatý kationt potřebný k správnému fungování OEC. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v *in vitro* podmínkách při navázaném PsbO2 na PSII vedlo k obdobným charakteristikám funkce PSII jako při navázaném PsbO1.

Uvedené skutečnosti vyústily v hypotézu, že PsbO1 je nutný především k normální funkci OEC za běžných podmínek. PsbO2 má pravděpodobně spíše regulační funkci potřebnou při výměně poškozeného proteinu D1 (Lundin *et al.* 2007a, 2008; Allahverdiyeva *et al.* 2009).



Obr. 2.9: Nemutované rostliny huseníčku (wt) a rostliny s inaktivovaným genem *psbO1* (*psbo1*) a *psbO2* (*psbo2*). Převzato z (Lundin *et al.* 2007b).

3 Metodika

3.1 Kultivované rostliny

3.1.1 Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) cv. Lada

Tato odrůda bramboru byla vyšlechtěna šlechtitelskou stanicí Selektu Pacov.

Ex vitro byly rostliny pěstovány ve skleníku z hlíz prošlých chladovým obdobím (minimálně 6 týdnů ve 4 °C) v plastových květináčích s běžným substrátem (cca 10 l; vždy několik rostlin dohromady). Rostliny byly pěstovány v období od dubna do června při normální fotoperiodě.

In vitro byly rostliny pěstovány ve zkumavkách naplněných do 1/3 LS médiem (Linsmaier & Skoog 1965) a uzavřených zátkou z gázy v kultivační místnosti s 16 hodinovou světelnou periodou a teplotou 23 °C.

3.1.1.1 LS médium

LS médium (Linsmaier & Skoog 1965) bylo připravováno podle Tab. 3.1. Hodnota pH média byla upravena na 5,8 pomocí KOH, následně bylo médium sterilizováno v autoklávu 20 minut při teplotě 120 °C.

Tab. 3.1: Složení LS média.

množství (v 1 l média)	složka
4,33 g	MSMO soli (Sigma-Aldrich)
30 g	sacharóza
0,1 g	<i>myo</i> -inositol
1 g	kasein
0,1 mg	vitamín B1
0,1 mg	vitamín B6
0,5 mg	kyselina nikotinová
3 mg	glycin
8 g	agar

3.2 Práce s nukleovými kyselinami

3.2.1 Bakteriální kmen použitý pro práci s nukleovými kyselinami

Pro molekulární klonování plasmidů byla využita bakterie *Escherichia coli* kmen DH5 α . Kultura byla kultivována při 37 °C obvykle přes noc, buďto v LB médiu provzdušňovaném třepáním, nebo na LA médiu v Petriho miskách. Složení médií LB a LA je uvedeno v Tab.

3.2. Do média bylo vždy přidáno antibiotikum podle toho, jaký gen kódující rezistenci nesl klonovaný vektor (obvykle kanamycin s finální koncentrací v médiu 50 µg/ml).

Tab. 3.2: Složení médií LB a LA.

médium	sterilizace	množství na 1 l média	složka
LB	autoklávováno (120 °C, 20 min)	10 g	pepton
		5 g	kvasinkový extrakt
		10 g	NaCl
LA	autoklávováno (120 °C, 20 min)	10 g	pepton
		5 g	kvasinkový extrakt
		10 g	NaCl
		17,5 g	agar

3.2.2 Izolace genomové DNA (gDNA) z listů bramboru

Izolace DNA byla prováděna podle Shure *et al.* (1983) s úpravami.

3.2.2.1 Roztoky pro izolaci DNA

Složení roztoků pro izolaci DNA je uvedeno v Tab. 3.3. Izolační pufr byl připraven těsně před izolací smícháním 2x izolačního pufru, 2x roztoku močoviny a 100x roztoku disiřičitanu v poměru 50 : 50 : 1.

Tab. 3.3: Složení roztoků pro izolaci DNA.

roztok	koncentrace	složka
2x izolační pufr	0,1 M	Tris pH 7,5
	0,6 M	NaCl
	40 mM	EDTA
	4 %	sarcosyl
	1 %	SDS
2x roztok močoviny	10 M	močovina
100x roztok disiřičitanu	2 M	Na ₂ S ₂ O ₅
TE pufr	10 mM	Tris pH 8,0
	1 mM	EDTA

3.2.2.2 Postup izolace

Z rostlin bramboru pěstovaných *in vitro* bylo sklizeno 150 mg lístků (pouze pěkných, tmavě zelených), které byly společně se dvěma ocelovými kuličkami uzavřeny do 2ml

mikrozkumavky a zmraženy kapalným dusíkem. Lístky byly kuličkami nadrceny v kulovém mlýnku Retsch MM301 (5 min, 25 Hz). Nosiče mikrozkumavek byly předem vychlazeny kapalným dusíkem.

Před rozmrznutím bylo k nadrceným listům přidáno 300 µl izolačního pufru a vzorek byl důkladně promíchán. Následně bylo přidáno 300 µl směsi fenolu o pH 8,0 s chloroformem (1 : 1) a vzorek byl krátce a důkladně zvortexován. Jednotlivé fáze byly od sebe odděleny centrifugací (7 min, 4 000 g). Horní (vodná, nažloutlá) fáze byla přenesena do nové mikrozkumavky, přičemž byl pipetou změřen její objem. K vodné fázi byl přidán isopropanol (vychlazený na -20 °C) o objemu 7/10 objemu vodné fáze. Vzorek byl promíchán převrácením mikrozkumavky. Vysrážená DNA byla přenesena pomocí špičky pipety do nové mikrozkumavky s 500 µl 70% ethanolu. Po 3 minutách odsolování byla DNA sedimentována krátkou centrifugací a po odsátí ethanolu pipetou vysušena. Vysušený sediment byl rozpuštěn ve 150 µl TE pufru s 15 µg RNázy A (Fermentas; do TE pufru bylo přidáno 1,5 µl roztoku o koncentraci 10 µg/µl) a inkubován 60 min ve 37 °C.

3.2.3 Izolace RNA z listů bramboru

Z *in vitro* pěstovaných rostlin bramboru bylo sklizeno 80 mg lístků, které byly zmraženy a nadrceny stejně jako při izolaci DNA (viz kap. 3.2.2). K izolaci RNA byl použit kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle přiloženého protokolu „Purification of total RNA from plant cells and tissues and filamentous fungi“. Jako lyzační pufr byl použit pufr RLT. Na konci byla RNA eluována pomocí 50 µl vody (RNase-free).

3.2.4 Měření koncentrace nukleových kyselin

Vyizolované nukleové kyseliny byly zředěny sterilní destilovanou vodou 100x (DNA), respektive 150x (RNA) na finální objem 300 µl. Pomocí spektrofotometru BioMate 5 (Thermo Spectronics) byla proti vodě změřena absorbance při 260 nm a 280 nm. Koncentrace původního vzorku byla stanovena podle vztahu:

$$c = A_{260 \text{ nm}} \cdot \varepsilon^{-1} \cdot l^{-1} \cdot \check{r}$$

$A_{260 \text{ nm}}$... absorbance při 260 nm

ε^{-1} ... převrácená hodnota extinkčního koeficientu (pro DNA 50 cm · µg · ml⁻¹, pro RNA 40 cm · µg · ml⁻¹)

l ... dráha světelného paprsku skrz měřený roztok (1 cm)

\check{r} ... ředění (100, respektive 150)

Poměr absorbancí $A_{260 \text{ nm}} : A_{280 \text{ nm}}$ byl určen kvůli zjištění případné nadměrné kontaminaci proteiny (optimálně by se hodnota měla pohybovat kolem 1,8).

3.2.5 Reverzní transkripce

Vzhledem k tomu, že RNA izolovaná kitem RNeasy bývá kontaminovaná genomovou DNA, je třeba napřed všechnu DNA enzymaticky rozložit.

3.2.5.1 Digesce DNA (reakce v objemu 10 µl)

1 µg RNA vyizolovaná kitem RNeasy
1 µl 10x pufr pro DNázu I (Fermentas)
1 µl (1 u) DNáza I (Fermentas)

Doplněno sterilní vodou do 10 µl. Digesce probíhala 30 minut při teplotě 37 °C. Následně byla DNáza inaktivována přidáním 1 µl 25mM EDTA a zahřátím na 65 °C na 10 minut.

3.2.5.2 Reverzní transkripce (reakce v objemu 20 µl)

RNA z předchozí reakce (5 µl) byla smíchána s 1 µl zakotveného (anchored) primeru oligoT₂₃ a 6,5 µl sterilní destilované vody. Vzorek byl denaturován 5 minut při 70 °C a následně rychle přenesen na led. Byly přidány 4 µl 5x pufru pro reverzní transkripci (Fermentas), 2 µl 10mM dNTP a 0,5 µl (20 u) inhibitoru RNáz RiboLock (Fermentas). Po nasednutí primerů (5 min při 43 °C) byl přidán 1 µl (200 u) reverzní transkriptázy M-MuLV (Fermentas) a proběhla reverzní transkripce (60 min při 42 °C). Po tepelné inaktivaci enzymů (10 min při 70 °C) byla cDNA skladována při –20 °C.

3.2.6 Primery

Pro izolaci genů *psbO1* a *psbO2* z genomu a transkriptomu bramboru byly použity následující primery, dodané firmou Generi Biotech:

psbO1F (přímý): 5'-TTGTCTACTCTCTCCATAGTCC-3'

psbO1R (zpětný): 5'-CGAGCTTGATAATATACAGCAAG-3'

psbO2F (přímý): 5'-ACCATCCAACCTGTCACACTTGT-3'

psbO2R (zpětný): 5'-CCAAACACAGACAGATTCAACG-3'

3.2.7 PCR

Míchání reakční směsi probíhalo na ledu.

Reakce v objemu 50 µl:

200 ng gDNA, respektive 1 µl cDNA
5 µl 10x pufr s (NH₄)₂SO₄ (Fermentas)
3 µl 25mM MgCl₂
1 µl 10mM dNTP
2x 1 µl 10µM primery

Doplněno destilovanou vodou do 49 µl, dále přidán:

1 µl (5 u) Taq polymeráza (Fermentas)

Reakční směs byla uzavřena do termocykleru s programem uvedeným v Tab. 3.4. Počet cyklů byl 35 (gDNA), respektive 40 (cDNA).

Tab. 3.4: Program termocykleru použitý pro PCR. Kroky 2. až 4. byly cyklicky opakovány 35x (gDNA), respektive 40x (cDNA).

krok programu		gDNA		cDNA	
1.	počáteční denaturace	94 °C	5 min	94 °C	2 min
2.	denaturace	94 °C	45 s	94 °C	30 s
3.	nasedání primerů	59 °C	45 s	55 °C	30 s
4.	polymerace	72 °C	2 min	72 °C	90 s
5.	přidání A na konec	72 °C	10 min	72 °C	10 min
6.	skladování	4 °C	∞	4 °C	∞

3.2.8 Agarózová DNA elektroforéza

K elektroforéze DNA byl používán 1,2% agarózový gel v 0,5x TAE pufru. Následná vizualizace DNA byla zajištěna barvivem GelRed (Biotium) přidaným do rozehrátého gelu v koncentraci 1 µl na 20 ml gelu. Vzorky (2–10 µl podle očekávané koncentrace DNA) byly před nanášením smíchány s 6x BPB v poměru 5 : 1. Podle očekávané velikosti fragmentů DNA byl na elektroforézu nanesen marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) nebo GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Intenzita elektrického pole byla používána nejčastěji 4 V/cm, v průběhu dělení byla někdy zvýšena na dvojnásobek (8 V/cm). Složení TAE pufru a nanášecího pufru jsou uvedeny v

Tab. 3.5 a Tab. 3.6.

Tab. 3.5: Složení 50x TAE pufru. Hodnota pH výsledného roztoku byla upravena na 8,0. K přípravě gelu a k jeho následnému převrstvení byl použit 100x zředěný pufr (0,5x TAE pufr).

množství (1 l pufru)	složka
242 g	Tris
57,1 ml	kyselina octová (ledová)
100 ml	0,5M EDTA pH 8,0

Tab. 3.6: Složení 6x BPB (nanášecího pufru). Hodnota pH byla zvýšena tak, aby měl roztok tmavomodrou barvu.

koncentrace	složka
0,025 %	bromfenolová modř
30 %	glycerol

3.2.9 Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

K izolaci DNA z agarózového gelu byl použit QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) podle příloženého návodu QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol. Na konci procesu byla DNA eluována dvakrát, nejprve 10 μ l 1mM Tris (pH 8,5), poté 5 μ l stejného pufru. Eluáty byly smíchány dohromady.

Čistota izolované DNA byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy. Zároveň byla porovnáváním intenzity fluorescence fragmentů markeru a analyzované DNA na gelu přibližně určena koncentrace DNA ve vzorcích.

3.2.10 Ligace PCR fragmentů do vektoru *pDrive*

Izolované PCR fragmenty byly vkládány do vektoru *pDrive* z ligačního kitu PCR Cloning Kit (Qiagen). Vzhledem k nízké koncentraci DNA izolované z agarózového gelu (přibližně 3 ng/ μ l) však nebyl použit Ligation Master Mix z kitu, ale samostatně pořízená T4 DNA ligáza. Míchání ligační směsi probíhalo na ledu.

Reakce v objemu 10 μ l:

7,5 μ l izolovaný fragment DNA

0,5 μ l *pDrive* (50 ng/ μ l, Qiagen)

1 μ l (5 u) T4 DNA Ligase (Fermentas)

1 μ l Ligation buffer 10x (Fermentas)

Ligace probíhala 2,5 h při 15 °C. Následovala inaktivace ligázy (10 min, 70 °C).

3.2.11 Příprava kompetentních buněk pro transformaci teplotním šokem (RbCl metoda)

Roztoky pro přípravu kompetentních buněk byly připraveny podle Tab. 3.7. Kultura *E. coli* byla pěstována přes noc na třepačce při 37 °C v 25 ml LB média, v případě expresních

kmenů s chloramfenikolem (34 µl/ml). Kultura byla přidána k 225 ml SOB média. Tato nová kultura byla pěstována na třepačce při 37 °C, dokud OD_{600 nm} nedosáhla hodnoty přibližně 0,7. Následně byly buňky chlazeny 10 min na ledu a pak sedimentovány (1700 g, 5 min, 4 °C). Sediment byl resuspendován v 90 ml roztoku RF1 a inkubován na ledu 15 min. Následovala opět sedimentace (1700 g, 5 min, 4 °C), po které byly buňky resuspendovány v 16 ml roztoku RF2, rozpipetovány po 220 µl do mikrozkupek, zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy do –80 °C.

Tab. 3.7: Roztoky a médium pro přípravu kompetentních buněk pro transformaci teplotním šokem.

roztok/médium	sterilizace	úprava pH	koncentrace	složka
SOB	autoklávováno (120 °C, 20 min)		2 %	pepton
			0,5 %	kvasinkový extrakt
			10 mM	NaCl
			2,5 mM	KCl
			10 mM	MgCl ₂
			10 mM	MgSO ₄
RF1	filtrováno (póry 0,45 µm)	pH 5,8 (pomocí kyseliny octové)	100 mM	RbCl
			50 mM	MgSO ₄
			30 mM	CH ₃ COOK
			10 mM	CaCl ₂
			150 ml/l	glycerol
RF2	filtrováno (póry 0,45 µm)	pH 6,8 (pomocí KOH)	10 mM	MOPS
			10 mM	RbCl
			75 mM	CaCl ₂
			150 ml/l	glycerol

3.2.12 Transformace *E. coli* plasmidovou DNA (metoda teplotního šoku)

Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu, 35–100 µl bylo přidáno k přibližně 10 ng plasmidové DNA (1 µl roztoku). Promíchaná směs byla inkubována 30 min na ledu. Následoval teplotní šok (1 min ve 42 °C teplé vodní lázni). Po chlazení 1 min na ledu byl přidán 1 ml SOC média (

Tab. 3.8) a buňky byly kultivovány na třepačce 45 min při 37 °C. Na předeřátou Petriho misku s LA médiem s 50 µg/ml kanamycinu bylo vyseto 100 µl kultury, zbytek buněk byl sedimentován (1 min, 10 000 g) a sediment byl vyset na malou část misky. Vysetá kultura byla inkubována přes noc při 37 °C.

Tab. 3.8: Složení SOC média.

médium	sterilizace	množství na 20 ml média	složka
SOC	filtrováno (póry 0,22 µm)	0,4 g	pepton
		0,1 g	kvasinkový extrakt
		72 mg	glukóza
		12 mg	NaCl
		4 mg	KCl
		19 mg	MgCl ₂
		24 mg	MgSO ₄

3.2.13 Příprava glycerolových konzerv z kultur *E. coli*

Část (200 µl) kultury *E. coli* pěstované přes noc v LB médiu s příslušným antibiotikem byla smíchána s 86 µl 50% glycerolu (finální koncentrace glycerolu byla 15 %). Směs byla zmrazena v kapalném dusíku a uchovávána v –80 °C, popřípadě rovnou umístěna do –80 °C.

3.2.14 Izolace plasmidů z *E. coli*

Pro izolaci plasmidů z bakterií byl použit Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek) podle přiloženého návodu. Jako vstupní materiál byly použity 3 ml kultury *E. coli* DH5α transformované požadovaným plasmidem, pěstované přes noc na třepačce při 37 °C. Na závěr postupu byla DNA eluována 60 µl elučního pufru.

3.2.15 Kontrola plasmidů štěpením

Pro ověření úspěšného vložení PCR fragmentů do vektorů *pDrive* a úspěšné izolace plasmidů byla část plasmidů naštěpena restrikční endonukleázou *EcoRI* (štěpící po stranách místa inserce) a analyzována pomocí DNA elektroforézy.

Reakce v objemu 10 µl:

3 µl	izolovaný plasmid
1 µl	10x <i>EcoRI</i> pufr (Fermentas)
0,2 µl (2 u)	<i>EcoRI</i> (Fermentas)
5,8 µl	voda

Štěpení probíhalo 1 h při 37 °C, reakční směs byla následně celá použita pro elektroforetickou analýzu.

3.2.16 Sekvenace

3.2.16.1 Primery

Sekvenace cDNA genu *psbO2* byla provedena pomocí primerů *M13F* a *M13R* na sedajících na plasmid *pDrive* před a za místem inzerce. Pro sekvenaci gDNA genu *psbO2* byl použit ještě primer *MBDR*, pro sekvenaci gDNA genu *psbO1* byl přidán i primer *MBD16F*. Primery byly dodány firmou Generi Biotech. Umístění primerů na sekvenci je na Obr. 4.1.

M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13R: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

MBDR: 5'-CTCCTCAAACCTTAACAGTGCC-3'

MBD16F: 5'-GCAACCAACAAAGGTTGGTGC-3'

3.2.16.2 Příprava vzorků

Pro sekvenaci insertu v plasmidu *pDrive* byla připravena následující směs (14 µl):

2 µl izolovaný plasmid

0,32 µl primer (10 µM)

11,68 µl voda

Připravené vzorky byly předány do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Obdržené sekvence a chromatogramy byly vyhodnocovány v programu BioEdit verze 7.0.5.3 (Hall, T. A. 1999).

3.3 Analýza tylakoidních proteinů

3.3.1 Izolace tylakoidů

Izolace tylakoidů byla prováděna podle Andaluz *et al.* (2006). Složení pufrů je uvedeno v

Tab. 3.9. Z rostlin bramboru starých přibližně 2 měsíce byly sklizeny nejmladší plně vyvinuté listy (obvykle třetí nejmladší list rostliny) o hmotnosti 10 g. Při sklizení byly uloženy na ledu. Následně byly listy nastrohávány nůžkami a společně s 20 ml pufru I rozmixovány v mixéru vychlazeném na ledu. Suspenze byla nahrubo přefiltrována přes tkaninu a následnou centrifugací (300 g, 2 min, 4 °C) byly odstraněny zbytky pletiv a buněčných stěn. Následnou centrifugací supernatantu (12 000 g, 10 min, 4 °C) byly sedimentovány tylakoidy. Peletka byla resuspendována v 5 ml pufru II a centrifugována 5 min při 12 000 g a 4 °C. Takto promyté tylakoidy byly resuspendovány v 1 ml pufru III, zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány v –80 °C.

Tab. 3.9: Složení pufrů pro izolaci tylakoidů.

pufr	koncentrace	složka
Pufr I	20 mM	Tricine pH 8,0
	400 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂
	0,2 %	BSA
Pufr II	20 mM	Tricine pH 8,0
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	0,2 %	BSA
Pufr III	50 mM	MES pH 6,0
	10 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	400 mM	sacharóza

3.3.2 Měření koncentrace proteinů (Bio-Rad Protein Assay)

Destilovaná voda (790–799 µl, podle množství vzorku) byla smíchána s 200 µl Bradfordova barviva (5x Bio-Rad Dye) a s 1–10 µl vzorku (podle předpokládané koncentrace proteinů). Roztok (o výsledném objemu 1 ml) byl promíchán na vortexu a ponechán 10 min stát při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při 595 nm proti obdobně připravenému roztoku bez proteinového vzorku (800 µl destilované vody s 200 µl barviva).

Kalibrační křivka byla připravena pomocí vzorků obsahujících 2, 4, 6, 8 a 10 µg BSA.

3.3.3 Analýza tylakoidních proteinů pomocí 2D IEF-SDS PAGE (dvourozměrné elektroforézy s izoelektrickou fokusací)

2D IEF-SDS PAGE (dvourozměrná proteinová elektroforéza s izoelektrickou fokusací) byla prováděna podle Görg *et al.* (2000). Složení roztoků a dělicího gelu jsou uvedeny v Tab. 3.10: Složení dělicího gelu obsahujícího 12% polyakrylamid.

objem	složka
2,12 ml	voda
4 ml	roztok monomerů (29% akrylamid a 1% bisakrylamid)
3,73 ml	1M Tris-HCl (pH 8,8)
50 µl	10% SDS
33 µl	40% persíran amonný
5 µl	TEMED

Tab. 3.11 a Tab. 3.10.

Suspenze tylakoidů bramboru o objemu 0,5 ml byla smíchána s 12,5 ml precipitačního roztoku. Směs byla důkladně promíchána, inkubována přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté centrifugována (30 min, 2 500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sediment byl 2–3x resuspendován ve 13 ml promývacího roztoku vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugován (20 min, 2 500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Takto promytý sediment byl vysušen při sníženém tlaku za laboratorní teploty.

Sediment byl rozpuštěn v 1 ml lyzačního pufru, koncentrace byla změřena pomocí kitu 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences).

Proteiny v lyzačním pufru byly naředěny rehydratačním roztokem obvykle tak, aby 200 μl vzorku obsahovalo 200 μg proteinů. Roztok byl krátce centrifugován, aby se oddělily případné precipitované proteiny. Vzorek (200 μl) byl nanesen do fokusačního tácku. Na elektrody byly přiloženy kousky filtračního papíru zvlhčené destilovanou vodou, zprostředkovávající kontakt stripu s elektrodami. Vysušený 11cm strip pro izoelektrickou fokusaci pro rozsah pI 4,7–5,9 (ReadyStrip, Bio-Rad) byl gelovou stranou položen na vzorek a převrstven minerálním olejem. Rehydratace gelu probíhala 8 hodin při 50 V a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izelektrická fokusace přímo navazovala na rehydrataci, probíhala v zařízení Protean IEF Cell (Bio-Rad) při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ podle následujícího programu: 15 min nárůst z 50 V na 250 V, dále během hodiny nárůst z 250 V na 8 000 V a následně dělení při 8 000 V až do celkového úhrnu 30 000 Vh.

Strip byl poté inkubován 10 min v ekvilibračním roztoku I a 10 min v ekvilibračním roztoku II. Následně byl opláchnut elektroforetickým pufrem, umístěn na ztuhlý dělicí gel a zalit rozehrátým roztokem agarózy, jemně obarveným bromfenolovou modří. Dělení bylo prováděno na elektroforetickém zařízení Multigel-Long (Biometra) při konstantním proudu 40 mA.

Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (viz kap. 3.4.10).

Tab. 3.10: Složení dělicího gelu obsahujícího 12% polyakrylamid.

objem	složka
2,12 ml	voda
4 ml	roztok monomerů (29% akrylamid a 1% bisakrylamid)
3,73 ml	1M Tris-HCl (pH 8,8)
50 μl	10% SDS
33 μl	40% persíran amonný
5 μl	TEMED

Tab. 3.11: Složení roztoků pro 2D IEF-SDS PAGE.

roztok	rozpuštědlo	koncentrace	složka
precipitační roztok	aceton	0,2 g/ml	kyselina trichloroctová
		0,7 µl/ml	β-merkapt ethanol
promývací roztok	aceton	0,7 µl/ml	β-merkapt ethanol
lyzační roztok	nasycený vodný roztok PMSF (< 25 mg ve 20 ml vody)	10 M	močovina
		2 %	CHAPS
		1 %	DTT
		1 µl/ml	ReadyStrip 4.7–5.9 buffer (Bio-Rad)
rehydratační roztok	voda	8 M	močovina
		0,5 %	CHAPS
		0,2 %	DTT
		1 µl/ml	ReadyStrip 4.7–5.9 buffer (Bio-Rad)
ekvilibrační roztok I	voda	50 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
		30 %	glycerol
		6 M	močovina
		2 %	SDS
		0,2 %	DTT
ekvilibrační roztok II	voda	50 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
		30 %	glycerol
		6 M	močovina
		2 %	SDS
		4,5 %	2-jodacetamid
roztok agarózy	voda	0,5 %	agaróza
		50 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
		385 mM	glycin
		0,1 %	SDS
elektroforetický pufr	voda	50 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
		385 mM	glycin
		0,1 %	SDS

3.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) proteinů štěpených trypsinem

Vybrané spoty na gelu byly vyříznuty a postupně odbarveny za současné redukce dithiothreitem a alkylace jodacetamidem. Proteiny byly štěpeny trypsinem (Promega) přes noc. Vzorky s matricí (20 mg/ml α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina v 80% acetonitrilu) byly vybuzeny pomocí Nd:YAG laseru (355 nm, frekvence 200 Hz). Hmotnostní spektra byla měřena v rozmezí 450–4 000 m/z na přístroji 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AB Sciex). Získaná spektra byla porovnávána s interní databází izoform PsbO bramboru a jejich variant (PsbO1a/b/c a PsbO2) pomocí programu Mascot v. 2.1 (Matrix Science) s nastavením: enzym – trypsin, fixní modifikace – karbamidomethylace, variabilní modifikace – oxidace

methioninu, tolerance měření – 80 ppm, povoleno jedno vynechané štěpení, povolena jednoaminokyselinová záměna nebo posttranslační modifikace.

3.4 Expres a purifikace PsbO

Expresní a purifikační protokol je založen na kurzu „Practical Course on Rapid Cloning, Protein Expression and Purification“, který na Umeå University vede Gunter Stier.

Ve všech krocích purifikace byly odebírány malé vzorky, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.4.1 Expresní vektory

Expresní vektory s vloženým genem *psbO* S95C (Tab. 3.12) poskytl Jan Karlsson (Umeå Plant Science Center), který je vytvořil. Vložený špenátový gen *psbO* S95C byl nasyntetizován *in vitro*, aby neobsahoval kodóny neobvyklé v *E. coli*. Kódovaný protein se navíc od původního PsbO ze špenátu liší výměnou serinu 95 za cystein. Použité expresní vektory pET s nosičovými proteiny, His-tagem a specifickým místem pro TEV proteázu vytvořil Gunter Stier. Všechny nesou gen pro rezistenci ke kanamycinu.

Pro velkoobjemovou expresi byl použit plasmid *pETDsbAin_1b* s vloženým *psbO* S95C, exprimující fúzní protein DsbAin-PsbO. DsbAin je zkrácená verze proteinu DsbA, které chybí signální sekvence a tudíž není exportována do periplasmatického prostoru. Sekvence fúzního proteinu (**DsbAin** modře, **His-tag** žlutě, **PsbO S95C** zeleně, specifické místo pro TEV proteázu podtržené):

MNAQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDNVKKKLPEGVKMTKYH
VNFMGGDLGKDLTQAWAVAMALGVEDKVTVPFLFEGVQKTQTIRSASDIRDVFINAGIKGEEY
DAAWNSFVVKSLVAQQEKAADVQLRGVPAMFVNGKYQLNPQGMDSNMDVVFVQQYADTVKY
LSEKKGSGSGSGHHHHHSAGSENLYFQGAMEGGKRLTYDEIQSKTYLEVKGTTANQCPTV
EGGVDSFAFKPGKYTAKKFCLEPTKFAVKAEGISKNSGPDFQNTKLMTRLTYTLDEIEGPFE
VCSDGTVKFEEKDGIDYAAVTVQLPGGERVPFLFTIKQLVASGKPESFSGDFLVPSYRGSSF
LDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEELQKENNKNVASSKGTITLSVTSSKPETGEVIGVF
QSLQPSDSDLGAKVPKDVKIEGVWYAQLEQ

Sekvence exprimovaného PsbO S95C po štěpení TEV proteázou (kromě záměny serinu 95 za cystein se od původního PsbO ze špenátu liší přidanou sekvencí GAM na N-konci) :

GAMEGGKRLTYDEIQSKTYLEVKGTTANQCPTVEGGVDSFAFKPGKYTAKKFCLEPTKFAV
KAEGISKNSGPDFQNTKLMTRLTYTLDEIEGPFEVCSDGTVKFEEKDGIDYAAVTVQLPGGE
RVPFLFTIKQLVASGKPESFSGDFLVPSYRGSSFLDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDEEE
LQKENNKNVASSKGTITLSVTSSKPETGEVIGVFQSLQPSDSDLGAKVPKDVKIEGVWYAQL
EQ

Tab. 3.12: Nosičové proteiny a uspořádání sekvencí v expresních vektorech.

nosič		pořadí částí vektoru
His6	pouze His-tag	T7/lacO-His6-Tev site-psbO
MBP	maltose-binding protein	T7/lacO-His6-MBP-Tev site-psbO
DsbAin	thioredoxin DsbA z <i>E. coli</i> (bez signální sekvence)	T7/lacO-DsbAin-His6-Tev site-psbO
ZZ	dvojitá Z-doména	T7/lacO-His6-ZZ-Tev site-psbO
GB1	B1 Ig-binding doména	T7/lacO-His6-GB1-Tev site-psbO

3.4.2 Expresní kmeny *E. coli*

Pro expresi rekombinantního proteinu byly použity kmeny *E. coli* BL21(DE3)pLysS a Origami(DE3) od firmy Novagen.

BL21 je kmen široce využívaný k expresi z pET vektorů. Má inaktivované geny *lon* and *ompT* kódující proteázy. Označení pLysS znamená, že kmen exprimuje T7 lysozym, který částečně inhibuje T7 RNA polymerázu, takže nedochází k bazální expresi před indukcí, což je výhodné zvláště u proteinů, které jsou pro bakterie toxické (webové stránky firmy Merck³).

Origami je kmen odvozený od kmenu K-12 určený pro expresi proteinů s S-S můstky. Nese mutace v genech pro thioredoxin reduktázu (*trxB*) a glutathion reduktázu (*gor*), což má za následek prostředí cytoplazmy buněk vhodnější k tvorbě S-S můstků (webové stránky firmy Merck⁴).

DE3 v označení obou kmenů značí, že nesou chromozomální kopii genu pro T7 RNA polymerázu (pod kontrolou *lacUV5* promotoru) a jsou tedy hostitelem lysogenu λ DE3 (webové stránky firmy Merck^{3, 4}).

³ http://www.merckmillipore.com/czech-republic/life-science-research/bl21de3plyss-competent-cells/EMD_BIO-69451/p_ip2b.s1OYzkAAAEjOB19.zLX, přístup 16.4.2012

⁴ http://www.merckmillipore.com/czech-republic/life-science-research/origami-2de3-competent-cells/EMD_BIO-71345/p_vE6b.s1OSA4AAAEjPRI9.zLX, přístup 16.4.2012

3.4.3 Autoindukční médium

Autoindukční médium ZYP-5052 bylo připravováno podle Tab. 3.13 a Tab. 3.14.

Tab. 3.13: Složení autoindukčního média (ZYP-5052).

roztok	objem	množství	složka
ZYP-5052 médium	1 l	928 ml	ZY médium
		1 ml	1M MgSO ₄
		1 ml	1000x stopové prvky
		20 ml	50x 5052
		50 ml	20x NPS
		2 ml	kanamycin 50 mg/ml

Tab. 3.14: Složení zásobních roztoků pro autoindukční médium.

roztok	objem	sterilizace	množství	složka	MW	konc.
ZY médium	928 ml	autoklávováno	10 g	Bacto Tryptone (BD)		
			5 g	kvasinkový extrakt (Merck)		
			925 ml	voda		
20x NPS	100 ml	filtrováno (póry 0,45 µm)	6,6 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	132	0,5 M
			13,6 g	KH ₂ PO ₄	136	1 M
			14,2 g	Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	178	0,8 M
50x 5052	100 ml	filtrováno (póry 0,45 µm)	25 g	glycerol		
			2,5 g	glukóza		
			10 g	laktóza		
1000x stopové prvky	100 ml	filtrováno (póry 0,45 µm)	50 ml	0,1M roztok FeCl ₃ . 6 H ₂ O (2,7 g ve 100 ml 1% HCl)	270	50 mM
			0,294 g	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	147	20 mM
			0,198 g	MnCl ₂ . 4 H ₂ O	198	10 mM
			0,288 g	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	288	10 mM
			47,6 mg	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	238	2 mM
			34 mg	CuCl ₂ . 2 H ₂ O	171	2 mM
			47,5 mg	NiCl ₂ . 6 H ₂ O	238	2 mM
			48,4 mg	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	242	2 mM
			400 µl	0,5M roztok H ₃ BO ₃ (1,53 g v 50 ml 60mM HCl)	61,2	2 mM

3.4.4 Pufry pro purifikaci

Při purifikaci byly používány pufry uvedené v Tab. 3.15.

Tab. 3.15: Složení pufů pro purifikaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

puf	koncentrace	složka
lyzační puf	20 mM	Tris (pH 8,0)
	10 mM	imidazol (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 μ M	Pefabloc SC (Sigma-Aldrich)
	2 μ l/ml	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
	10 μ g/ml	DNáza I
	100 μ g/ml	lysozym
promývací roztok 1	20 mM	Tris (pH 8,0)
	10 mM	imidazol (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 μ M	Pefabloc SC
	2 μ l/ml	Igepal
promývací roztok 2	20 mM	Tris (pH 8,0)
	10 mM	imidazol (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 μ M	Pefabloc SC
promývací roztok 3	16 mM	Tris (pH 8,0)
	8 mM	imidazol (pH 8,0)
	1,12 M	NaCl
	0,8 μ M	Pefabloc SC
promývací roztok 4	20 mM	Tris (pH 8,0)
	26 mM	imidazol (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 μ M	Pefabloc SC
eluční puf	13 mM	Tris (pH 8,0)
	340 mM	imidazol (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
	0,7 μ M	Pefabloc SC
puf A	20 mM	Tris (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 μ M	Pefabloc SC
CD puf	10 mM	Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄ (různá pH)
	150 mM	NaCl

3.4.5 Test exprese PsbO v malém měřítku

3.4.5.1 Kultivace expresní kultury

ZYP-5052 médium (10 ml) v 50ml zkumavkách bylo inokulováno vždy jednou kolonií expresního kmene *E. coli* transformovaného expresním vektorem. Kultury byly kultivovány

na třepačce (180 min^{-1}) při $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Poté byly buňky sedimentovány, zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy do $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5.2 Purifikace proteinu v malém měřítku

Buňky byly rozmrazeny a resuspendovány v 1 ml lyzačního pufru a sonikovány na ledu, dokud suspenze nezačala pění. Zbytky buněk byly sedimentovány centrifugací ($14\,000 \text{ g}$, 5 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl přelit na chromatografickou kolonku Micro Bio-Spin (Bio-Rad) s přibližně $30 \text{ }\mu\text{l}$ Ni-NTA agarózy (Qiagen) ekvilibrované lyzačním puftrem. Proteklý lyzát byl 3x napipetován zpět na kolonku. Kolonka byla promyta vždy 1 ml promývacího roztoku 1 až 3 a pak ještě jednou 1 ml promývacího roztoku 2 (pro odstranění vysoké koncentrace NaCl). Krátkou centrifugací (1000 g , 10 s) byl z Ni-agarózy odstraněn zbytek posledního promývacího roztoku. Na kolonku bylo napipetováno $95 \text{ }\mu\text{l}$ elučního pufru a ponecháno několik minut, aby se nasákl do Ni-agarózy. Eluce byla provedena krátkou centrifugací (1000 g , 10 s). Část elátu ($50 \text{ }\mu\text{l}$) byla 2 h štěpena $3 \text{ }\mu\text{g}$ TEV proteázy ($3 \text{ }\mu\text{l}$ roztoku s koncentrací 1 mg/ml poskytnutého Protein Expertise Platform, Chemistry Department, Umeå University) při laboratorní teplotě.

3.4.6 Exprese proteinu ve velkém měřítku

3.4.6.1 Kultivace expresní kultury

Inokulum: 10 ml LB média s kanamycinem ($50 \text{ }\mu\text{g/ml}$) a chloramfenikolem ($34 \text{ }\mu\text{g/ml}$) bylo zaočkováno $1 \text{ }\mu\text{l}$ glycerolové konzervy buněk BI21(DE3)pLysS transformovaných plasmidem *pETDsbAin_1b* s vloženým špenátovým *psbO* S95C. Kultura byla kultivována na třepačce při $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc.

Autoindukční médium ZYP-5052 (1 l) bylo předehřáto přes noc na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozděleno do dvou Erlenmayerových baněk o objemu 1 l . Každá banka (s $0,5 \text{ l}$ média) byla inokulována 5 ml připravené kultury. Kultura byla kultivována na třepačce (180 min^{-1}) nejprve $2,5\text{--}3 \text{ h}$ v $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (přibližně dokud $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ nedosáhla hodnoty $0,6$), pak byla teplota snížena na $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a kultura byla pěstována do dalšího dne, obvykle $20\text{--}25 \text{ h}$.

3.4.6.2 Sklizení expresní kultury

Buňky byly sedimentovány ($10\,000 \text{ g}$, 20 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Sedimenty ve velkých centrifugačních lahvích byly resuspendovány v malém objemu supernatantu a přeneseny do 50 ml zkumavek. Po opětovné centrifugaci ($3\,000 \text{ g}$, 20 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) byl odlit supernatant a sediment byl zvážen. Výtěžek z 1 l kultury byl obvykle kolem 6 g čerstvé hmotnosti. Sediment byl uchováván při $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.6.3 Příprava a údržba kolonek

Na izolaci proteinu z 1 l expresní kultury byly použity 2 chromatografické kolonky Econo-Pac (Bio-Rad), každá s 6 ml usazené Ni-NTA agarózy (Macherey-Nagel). Kolonky byly před použitím promyty vodou a ekvilibrovány minimálně 30 ml promývacího roztoku 2. Po použití byly kolonky promyty 1M imidazolem a velkým množstvím vody a pak naplněny 30% ethanolem a skladovány ve 4 °C. V případě, že Ni-agaróza při použití změnila barvu nebo po promytí imidazolem stále obsahovala nějaké viditelné nečistoty, byla regenerována (promyta 60 ml vody, zbavena Ni^{2+} iontů promytím 60 ml 100mM EDTA pH 8, promyta 60 ml vody, regenerována 12 ml 100mM NiCl_2 a promyta 60 ml vody).

3.4.6.4 Izolace fúzního proteinu – 1. afinitní chromatografie

Všechny pufrы potřebné k izolaci byly před použitím vychlazený na ledu. Kolonky byly v laboratorní teplotě.

Zmražené sedimentované buňky byly resuspendovány v lyzačním pufru (10 ml na 1 g buněk, tedy 30–35 ml na sediment z 0,5 l kultury). Buňky byly lyzovány protlačením dvakrát skrz French press vychlazený na 4 °C pod tlakem 600–800 bar. Nerozpustné zbytky buněk byly odstraněny centrifugací (35 000 g, 30 min, 4 °C). Supernatant by přefiltrován přes filtr s 0,45 μm póry, promíchán s ekvilibrovanou Ni-agarózou a přelit i s ní do 50ml zkumavky. Suspenze byla jemně míchána na ledu na třepačce 10–60 min, aby se His-tagem označený protein mohl navázat na Ni^{2+} ionty, a pak nalita zpět na kolonku. Prošlá tekutina (flowthrough) byla dvakrát znovu nanášena na kolonku.

Každá kolonka byla promyta 60 ml každého z promývacích roztoků 1 až 4. Promývacím roztokem 4 bylo často eluováno relativně velké množství rekombinantního proteinu o stejné čistotě jako v eluátu. V takovém případě byla prošlá tekutina z promývacího roztoku 4 smíchána (po kontrole na gelu) s eluátem, někdy bylo dokonce promývání promývacím roztokem 4 zcela vynecháno.

Fúzní protein byl eluován 30 ml elučního pufru.

3.4.6.5 Proteolytické štěpení fúzního proteinu

V eluátu z 1. afinitní chromatografie, obsahujícím fúzní protein, byla změřena koncentrace proteinů. Z 1 l kultury (v případě vynechání promývacího roztoku 4) bylo získáno obvykle 300 až 400 mg fúzního proteinu. Nosičový protein DsbAin s His-tagem byl z PsbO odštěpen pomocí rekombinantní TEV proteázy s His-tagem (poskytnuté Protein Expertise Platform, Chemistry Department, Umeå University). TEV proteáza byla používána v množství 1 mg na 100 mg fúzního proteinu. Toto množství však často nerozštěpilo všechny fúzní protein, proto bylo zvyšováno v některých případech až na 2,3 mg na 100 mg fúzního proteinu.

3.4.6.6 Výměna pufru

Před prováděním druhé afinitní chromatografie bylo nutné vyměnit pufr, aby se opět snížila koncentrace imidazolu a nosičový protein a TEV proteáza s His-tagem se mohly navázat na Ni-agarózu.

Naštěpený eluát byl několikrát zakoncentrován v centrifugačních filtrech Amicon Ultra-15, MWCO 10 000 (Millipore) a naředěn pufrém A tak, aby se koncentrace imidazolu snížila pod 10 mM. Konečný objem vzorku byl obvykle přibližně 40 ml, aby se vzorek vešel do dvou Ni-agarózových kolonek. Filtrace v centrifugačních filtrech probíhaly při 3 838 g a 4 °C. Centrifugační filtry byly používány pro stejný typ vzorku opakovaně, skladovány byly při 4 °C v pufru, aby se zabránilo vyschnutí.

3.4.6.7 Izolace odštěpeného proteinu PsbO – 2. afinitní chromatografie

Pro 2. afinitní chromatografii byly po promytí či obnovení použity stejné kolonky jako pro 1. afinitní chromatografii. Každá kolonka byla ekvilibrována minimálně 20 ml pufru A. Vzorek (naštěpený eluát z 1. afinitní chromatografie) byl rozdělen na dvě části a nanesen na kolonky. Proteklá tekutina byla minimálně 2x znovu nanесena na kolonku. Konečná proteklá tekutina (flowthrough) by měla obsahovat poměrně čistý PsbO. Nosičový protein (DsbAin), TEV proteáza a zbytek nenaštěpeného fúzního proteinu by měly zůstat navázané na Ni-agaróze pomocí His-tagu.

V některých případech byl ještě z kolonky eluován nespecificky vázaný PsbO pomocí pufru A s nízkou koncentrací imidazolu (10–20 mM), popřípadě byla aspoň pomocí 6 ml pufru A z kolonky vytlačena tekutina nasáklá v Ni-agaróze.

Specificky vázané proteiny byly z kolonky eluovány 25 ml elučního pufru.

3.4.6.8 Zakoncentrování PsbO

Před gelovou filtrací bylo nutné PsbO zakoncentrovat, k čemuž byly opět použity centrifugační filtry Amicon Ultra-15, MWCO 10 000 (Millipore). Filtrace probíhaly při 3 838 g a 4 °C. Objem roztoku PsbO vyizolovaného z 1 l kultury byl obvykle zredukován na 7–8 ml.

3.4.6.9 Gelová filtrace

Gelová filtrace (GF) byla použita pro přečištění PsbO. Použité parametry jsou uvedeny v Tab. 3.16.

Tab. 3.16: Parametry gelové filtrace.

kolona	Superdex 75 16/60
pufr	CD pufr
pH pufru	8,0
ekvilibrace	
objem pufru (násobky objemu kolony)	1,5
průtok	1 ml/min
vzorek	
koncentrace proteinů	8–17 mg/ml
objem smyčky se vzorkem	4 ml
průtok	1 ml/min
objem sbíraných frakcí	2 ml
objem pufru (násobky objemu kolony)	1,3

3.4.7 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) celých proteinů

Vybrané frakce z gelové filtrace byly zakoncentrovány pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra-4, MWCO 10 000 (Millipore) na koncentraci 4–6 mg/ml a analyzovány MALDI-TOF MS. Jako matrice byla použita kyselina sinapová (Agilent Technologies G2033A). Spektra byla měřena v rozsahu 1000–140 000 m/z na přístroji Voyager STR-DE (AB Sciex).

3.4.8 CD spektrometrie

Frakce z gelové filtrace obsahující podle SDS-PAGE čistý PsbO byly smíchány a zakoncentrovány pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra-15, MWCO 10 000 (Millipore), zároveň byly proteiny převedeny do CD pufrů o pH 5,7 a 7,2. CD spektra byla měřena v 0,1 mm silné kyvetě na spektrometru J-715 (JASCO Corp.) při teplotě $20,3 \pm 0,2$ °C. Koncentrace PsbO byla 0,3 mg/ml, spektra byla měřena při obou hodnotách pH před a několik minut po přidání β -merkaptoethanolu do koncentrace 4 mM. Každý vzorek byl měřen 8x a spektra byla zprůměrována. Od každého průměrného spektra bylo odečteno stejně získané spektrum daného pufru a byla provedena korekce na nulu (odečtení průměru hodnot mezi 250 a 260 nm).

3.4.9 Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

Proteinová elektroforéza byla prováděna podle (Laemmli 1970) s úpravami. Složení pufrů a gelů je uvedeno v Tab. 3.17.

Namíchaný dělicí gel (TEMED a APS byly přidány až těsně před naléváním) byl nalit mezi připravená skla, převrstven isobutanolem saturovaným vodou a ponechán přibližně hodinu polymerovat. Ze ztuhlého gelu byl odlit isobutanol, vršek gelu byl opláchnut vodou a vysušen filtračním papírem. Namíchaný zaostřovací gel (TEMED a APS opět přidány těsně před naléváním) byl nalit na dělicí gel k okraji skel, a než začal tuhnout, byl do něj vložen hřeben vytvářející jamky pro vzorky. Po zhruba hodině polymerace bylo odstraněno těsnění mezi skly, gel byl opláchnut vodou a vložen do zařízení na provádění elektroforézy ve vertikálním uspořádání. Do zařízení byl nalit elektroforetický pufr, z gelu byl vyjmut hřeben a jamky byly propláchnuty elektroforetickým pufrem.

K následné orientaci v gelu byl použit marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Elektroforetické dělení probíhalo obvykle při konstantním elektrickém proudu 18 mA na jeden gel a teplotě 4 °C. Ukončeno bylo ve chvíli, kdy bromfenolová modř z nanášecího pufru dorazila na konec gelu.

Tab. 3.17: Složení gelů a pufrů pro SDS-PAGE.

gel/pufr	množství/koncentrace	složka
12% dělicí gel (20 ml)	6,7 ml	voda
	5 ml	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
	8 ml	30% akrylamid/bisakrylamid 29 : 1 (Bio-Rad)
	200 µl	10% SDS
	10 µl	TEMED
	100 µl	10% APS
4% zaostřovací gel (10 ml)	5,8 ml	voda
	2,5 ml	1,5M Tris-HCl (pH 6,8)
	1,3 ml	30% akrylamid/bisakrylamid 29 : 1 (Bio-Rad)
	100 µl	10% SDS
	10 µl	TEMED
	50 µl	10% APS
elektroforetický pufr 1x	25 mM	Tris
	200 mM	glycin
	0,1 %	SDS
nanášecí pufr 5x	0,3125 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	250 µl/ml	β-merkaptoethanol
	500 µl/ml	glycerol
	0,05 %	bromfenolová modř

3.4.10 Barvení polyakrylamidových gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Po ukončení elektroforetického dělení byl gel vyjmut ze skel, opláchnut vodou a minimálně hodinu barven v barvicím roztoku (Tab. 3.18) při pomalém míchání na třepačce. Následně byl opláchnut vodou a odbarvován opět na třepačce v odbarvovacím roztoku (Tab. 3.18), dokud nedošlo k odbarvení pozadí gelu. Odbarvovací roztok byl v průběhu měněn vždy, když získal modrou barvu. Odbarvený gel byl opláchnut vodou od methanolu a skladován ve 4 °C ve vodě s trochou ethanolu.

Tab. 3.18: Složení roztoků pro barvení polyakrylamidových gelů.

roztok	filtrace	množství v 1 l	složka
barvicí roztok	přefiltrováno přes filtrační papír	1 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
		400 ml	methanol
		100 ml	kyselina octová
		500 ml	voda
odbarvovací roztok	-	500 ml	methanol
		100 ml	kyselina octová
		400 ml	voda

3.5 *In silico* analýzy

3.5.1 Práce se sekvencemi mRNA

Sekvence PUT (PlantGDB-assembled unique transcripts, contigy složené ze sekvencí EST) byly vyhledávány v databázi PlantGDB (Plant Genome Database) pomocí programu TBLASTN 2.2.18 (Altschul *et al.* 1997, 2005) dostupného prostřednictvím webového rozhraní (<http://plantgdb.org/cgi-bin/blast/PlantGDBblast>). Jako dotaz (query) byla použita aminokyselinová sekvence izoformy PsbO2 bramboru, vyhledávání bylo pokaždé omezeno na určitý druh rostliny. Z výsledků vyhledávání byly ručně vybrány unikátní sekvence PUT, které kódují celý PsbO a jsou dostatečně věrohodné (contig je vytvořen z většího množství EST, které se dostatečně překrývají).

Pro některé druhy rostlin, pro které nebyly dostupné dostatečně kvalitní sekvence PUT, byly contigy vytvořeny v programu Geneious Pro 5.6.4 (Biomatters) ze sekvencí EST získaných z databáze NCBI. EST specifické pro PsbO daného druhu byly vyhledávány v EST databázi NCBI programem TBLASTN 2.2.26+ (Altschul *et al.* 1997, 2005) dostupným pomocí webového rozhraní (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Použity byly následující parametry: dotaz (query) – aminokyselinová sekvence izoformy PsbO2 bramboru, taxonomické omezení na určitý druh rostliny, max target sequences – 500, expect threshold – 10.

Sekvence mRNA *Arabidopsis lyrata*, *Spinacia oleracea* a *Medicago truncatula* byly získány z databáze NCBI obdobně jako sekvence EST, akorát byla prohledávána databáze referenčních RNA sekvencí (refseq_rna).

Dále bylo se sekvencemi pracováno v programu Geneious. V sekvencích byly nalezeny otevřené čtecí rámce kódující PsbO, 5' UTR a 3' UTR (nepřekládané oblasti) byly odstraněny. Nukleotidové kódující sekvence byly zarovnány pomocí překladu do aminokyselinové sekvence (translation align) metodou MAFFT v6.814b (Katoh *et al.* 2002); algoritmus G-INS-i, skórovací matice BLOSUM62). Podle anotací v databázi UniProt (<http://www.uniprot.org>) byly sekvence rozděleny na sekvence kódující signální peptid a sekvence kódující vlastní protein. Anotace všech sekvencí PsbO vyšších rostlin dostupných v databázi UniProt se v určení signálního peptidu shoduje, u ostatních sekvencí byl rozsah signální sekvence určen podle podobnosti.

Fylogenetické stromy byly tvořeny metodou Neighbor-Joining (model: Jukes-Cantor, počet bootstrapových opakování: 1 000).

3.5.2 Práce s genomovými sekvencemi

Genomové sekvence *psbO* byly vyhledávány v databázi referenčních genomových sekvencí (refseq_genomic) NCBI programem TBLASTN 2.2.26+ (Altschul *et al.* 1997, 2005) dostupným pomocí webového rozhraní (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Jako dotaz (query) byla použita aminokyselinová sekvence izoformy PsbO2 bramboru, vyhledávání bylo pokaždé omezeno na určitý druh rostliny. Z výsledků vyhledávání byly ručně vybrány sekvence kódující celý PsbO. Genomové sekvence *psbO* rajčete byly získány obdobným způsobem z databáze Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>). Genomové sekvence *psbO* bramboru byly získány sekvenací (viz kap. 3.2).

Dále bylo se sekvencemi pracováno v programu Geneious obdobným způsobem jako se sekvencemi mRNA. Introny a exony byly v sekvencích určeny porovnáním s odpovídajícími sekvencemi mRNA.

3.5.3 Homologní modelování struktury PsbO2 bramboru

Model struktury PsbO2 bramboru byl vytvořen pomocí serveru Swiss-Model v. 8.05 (<http://swissmodel.expasy.org>; Arnold *et al.* 2006). Jako templát byly použity sekvence PsbO2 bramboru a PsbO sinice *Thermosynechococcus elongatus* zarovnané pomocí programu ClustalW2 a struktura PsbO sinice *T. elongatus* dostupná v databázi Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) pod označením 3BZ1, řetězec O (Guskov *et al.* 2009). Barevné značení částí struktury a náhledy na strukturu byly vytvářeny v programu Swiss-PdbViewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997).

3.5.4 Výpočet izoelektrického bodu a hmotnosti proteinu

Teoretické molekulové hmotnosti a izoelektrické body proteinů byly vypočítány pomocí webové aplikace Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi; Gasteiger *et al.* 2005).

4 Výsledky

4.1 Izolace genomové a cDNA verze genů kódujících PsbO v bramboru

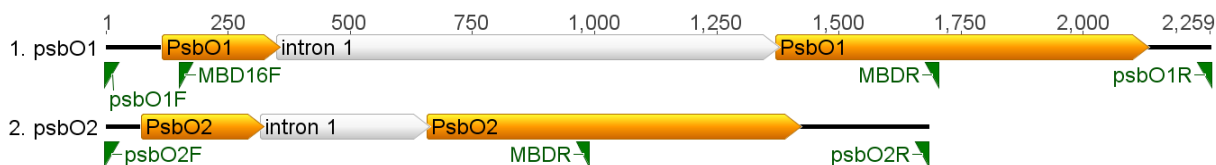
4.1.1 Popis a uspořádání experimentu

Prvním cílem bylo získat z bramboru cDNA genu *psbO2*, který by byl následně spolu s *psbO1* využitelný jednak pro expresi proteinů PsbO v bakteriích za účelem *in vitro* analýz a přípravy protilátek a jednak pro případné další funkční analýzy (například pro heterologní expresi v huseníčku). cDNA genu *psbO1* byla již dříve izolována L. Fischerem.

Druhým cílem bylo izolovat a sekvenovat genomovou DNA (gDNA) genů *psbO1* a *psbO2*, abychom získali sekvence intronů pro fylogenetické analýzy. Přítomnost intronu 1 v genech *psbO* bramboru byla velice pravděpodobná, protože intron 1 se nachází v genech *psbO* všech rostlin, jejichž genomové sekvence jsou dostupné v databázích (viz kap. 4.4.5).

Vzhledem k tomu, že k dosažení obou cílů bylo třeba využít obdobných metod, většina technik byla prováděna současně.

Z rostlin bramboru pěstovaných *in vitro* byla izolována gDNA a RNA. Izolovaná RNA byla ošetřena DNázou a za použití reverzní transkriptázy a oligoT primeru byla mRNA přepsána do cDNA. Pomocí PCR byly jak z cDNA, tak z gDNA namnoženy úseky kódující PsbO1 a PsbO2. Pozice použitých primerů jsou znázorněny na Obr. 4.1. Primery byly navrženy podle sekvencí cDNA dostupných v databázi PlantGDB (více viz kap. 4.4). Rozložení primerů bylo zvoleno tak, aby s jejich použitím mohly být sekvenovány i celé introny. Předpokládaná délka intronů u bramboru byla odvozena z délky intronů u rajčete, u kterého jsou v databázi PlantGDB dostupné genomové sekvence obou izoform *psbO*. PCR amplifikaci z cDNA bylo nutné optimalizovat, prvně použitých 30 cyklů bylo příliš málo pro dostatečnou amplifikaci, proto muselo být použito 40 amplifikačních cyklů. PCR fragmenty byly vloženy do vektoru *pDrive*, namnoženy v *E. coli* a sekvenovány.



Obr. 4.1: Schéma genů *psbO1* a *psbO2* bramboru s vyznačeným intronem a místy nasedání primerů. Izolační PCR proběhla za účasti primerů *psbO1F/R* a *psbO2F/R*. Sekvence byla zajištěna vnějšími primery *M13F/R* (nejsou zobrazeny, nasedají na přilehlé úseky vektoru *pDrive* a směřují k insertu) a primery *MBDR* a *MBD16F*. Primer *MBD16F* byl použit jen pro sekvenaci prvních dvou klonů, pak bylo zjištěno, že délka čtení z ostatních primerů je dostatečně velká, aby nebyl třeba. Primer *MBDR* nasedá na úsek plně konzervovaný mezi oběma izoformami.

4.1.2 Výsledky

4.1.2.1 Příprava cDNA genu *psbO2* z bramboru

Sekvenováno bylo 6 klonů cDNA genu *psbO2*. Jejich sekvence byla porovnána se sekvencí mRNA získanou z Plant Genome Database (<http://www.plantgdb.org>; PUT-157a-Solanum_tuberosum-55973153). U žádného klonu nebyla 100% shoda se sekvencí z databáze, sekvence se lišily povětšinou jednonukleotidovými záměnami, které ve 3 případech z 8 měnily aminokyselinovou sekvenci proteinu. Vzhledem k tomu, že pouze 2 ze 6 sekvenovaných klonů byly zcela identické, většina jednonukleotidových záměn u ostatních klonů pravděpodobně vznikla arteficiálně – chybami Taq polymerázy při PCR amplifikaci. Nejspíše se nejednalo o přirozené alelické varianty. Zmíněné dva identické klony se plně shodovaly se sekvencí z databáze v oblasti kódující protein, proto byly vybrány pro další experimenty.

4.1.2.2 Izolace genomových sekvencí *psbO1* a *psbO2*

Úspěšně osekvenováno bylo 6 klonů gDNA *psbO1* a 4 klony gDNA *psbO2*. Jak je vidět z Obr. 4.2 a Obr. 4.3, žádné dvě sekvence intronů nebyly zcela identické, ani u jedné z izoform. Sekvence se lišily především jednonukleotidovými záměnami, v několika případech krátkou delecí či inzercí. Sekvence se shodnými záměnami na více místech lze pravděpodobně označit za přirozeně se vyskytující alelické varianty. Například mezi sekvencemi intronu genu *psbO1* (Obr. 4.2) lze rozeznat tři pravděpodobné alely - alela A (klon 11), alela B (klony 8 a 12) a alela C (klony 7, 9 a 10). Rozdíly mezi sekvencemi v rámci předpokládané alely byly pravděpodobně způsobené jako artefakt při PCR (díky chybovosti Taq polymerázy).

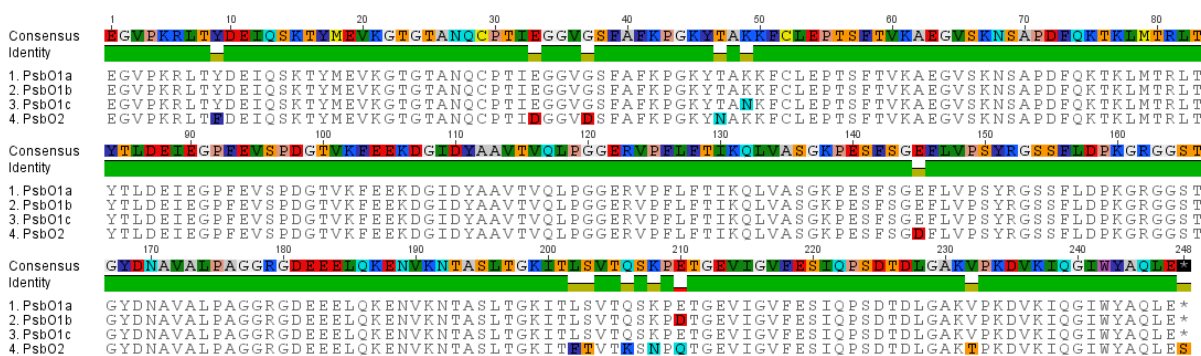
4.2 Identifikace proteinových spotů PsbO na gelu z 2D IEF-SDS PAGE

4.2.1 Popis a uspořádání experimentu

Lukáš Fischer ve své práci (Fischer *et al.* 2008) charakterizoval mutantní spontánně tuberizující linii bramboru D69. Na úrovni proteomu zjistil, že tomuto mutantu chybí jedna izoforma PsbO (PsbO1a, viz dále). Při analýzách přidružených spotů (proteinových skvrn) bylo zjištěno, že PsbO tvoří na gelech z 2D IEF-SDS PAGE s proteiny z listů bramboru 4 spoty o různých izoelektrických bodech. Pomocí MALDI TOF/TOF hmotnostní spektrometrie byly tyto spoty určeny jako 3 varianty izoformy 1 (PsbO1a, PsbO1b a PsbO1c), lišící se jednoaminokyselinovými záměnami (Obr. 4.4), a izoforma 2 (PsbO2). Přítomnost variant izoformy 1 na úrovni DNA i mRNA byla potvrzena pomocí PCR.

V dalších experimentech se na 2D gelech s vysokým rozlišením v dané oblasti izoelektrických bodů objevily ještě další spoty tvořené PsbO. Naším cílem bylo zjistit, který spot tvoří která izoforma či varianta izoformy a zda jsou změny v izoelektrických bodech způsobené posttranslačními modifikacemi PsbO.

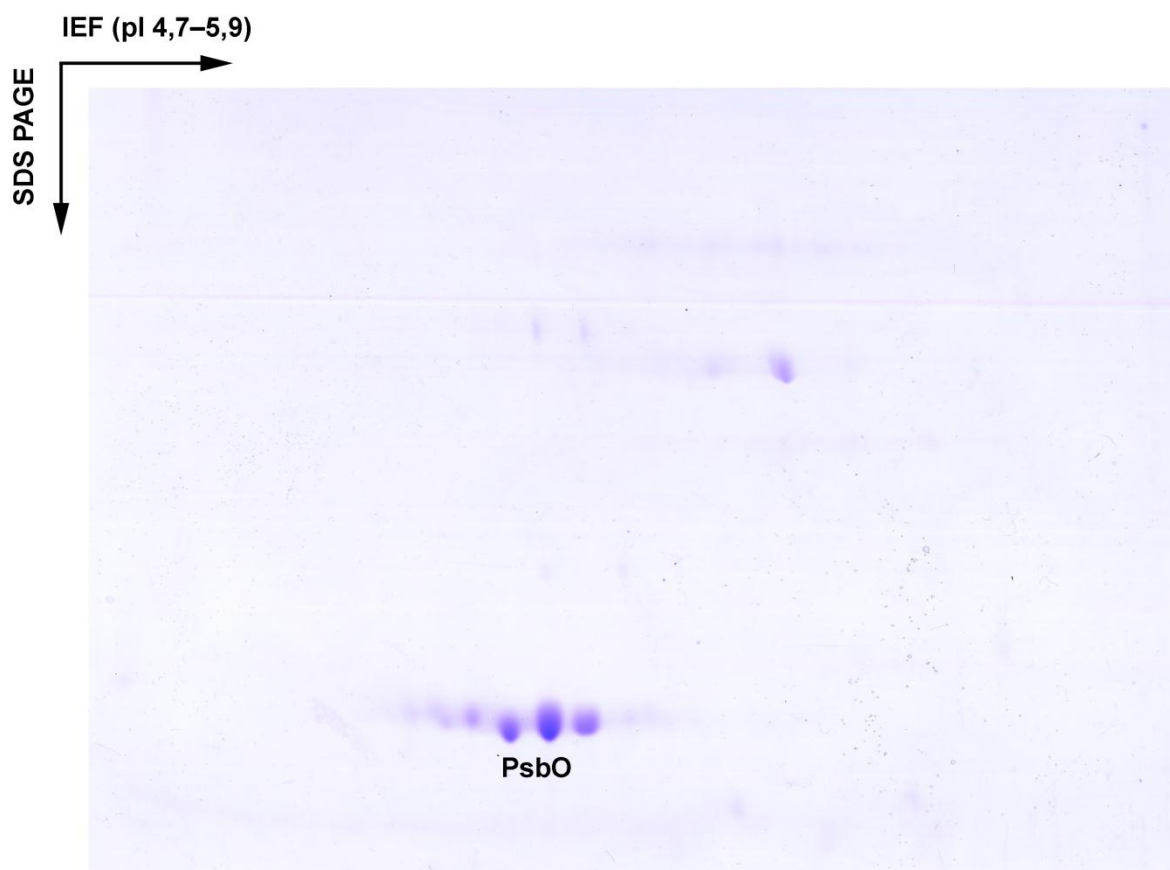
Aby byl při elektroforéze zajištěn lepší poměr PsbO a ostatních proteinů, byly proteiny izolovány z tylakoidů izolovaných z listů bramboru. Pro izoelektrickou fokusaci byl použit úzký rozsah pH (pH 4,7–5,9). Střední zóny spotů přítomných v oblasti gelu, kde by měl být PsbO, byly vyřezány a podrobeny analýze pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (ve spolupráci s Laboratoří hmotnostní spektrometrie PřF UK).



Obr. 4.4: Srovnání aminokyselinových sekvencí variant izoform PsbO bramboru. Aminokyseliny rozdílné oproti konsenzuální sekvenci jsou vyznačeny barevně. Alignment vytvořen v programu Geneious Pro 5.5.6 (Biomatters).

4.2.2 Výsledky

Z gelu z 2D IEF-SDS PAGE (Obr. 4.5) je vidět, že PsbO je majoritní protein v tylakoidech v daném rozmezí izoelektrických bodů (pI 4,7–5,9). V gelu je možné identifikovat až 10 spotů náležejících k PsbO, které byly označeny A až J (Obr. 4.6). Spoty B a C a spoty G a H částečně splývají.



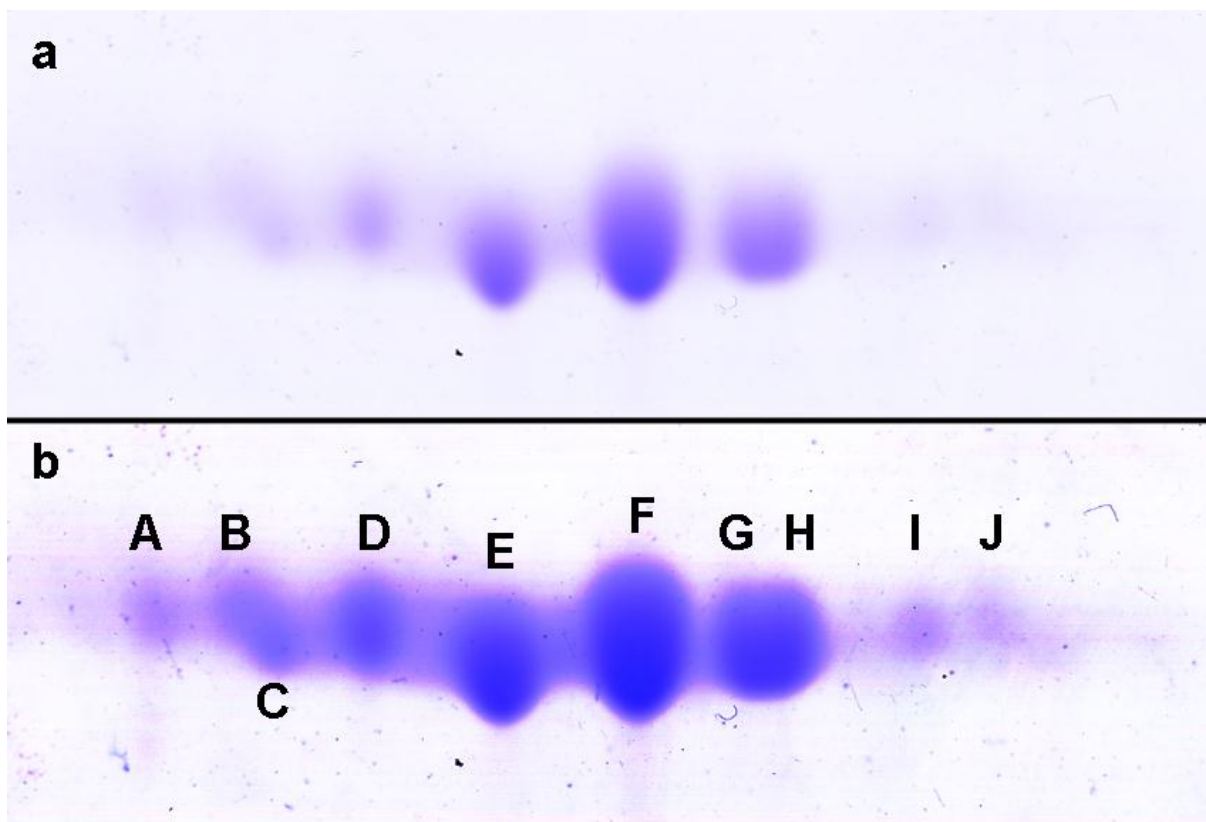
Obr. 4.5: Gel z 2D IEF-SDS PAGE tylakoidů bramboru. Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue. Jak je vidět, PsbO je nejhojněji zastoupený protein v tomto rozmezí izoelektrických bodů.

MALDI-TOF hmotnostní spektra trypsinem štěpených proteinů byla pomocí programu Mascot v. 2.1 (Matrix Science) porovnávána se sekvencemi izoform a variant izoform bramboru, s možností dalších modifikací (posttranslační modifikace a bodové mutace). Program Mascot žádnou posttranslační modifikaci ani další bodovou mutaci nenašel. Ani identifikace již známých izoform neposkytovala spolehlivé výsledky, proto byla spektra porovnána ručně. Pomocí webové aplikace PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass; (Gasteiger *et al.* 2005) byly určeny teoretické hmotnosti trypsinových štěpů a vybrány peptidy specifické pro jednotlivé izoformy a jejich varianty. Ve spektrech byly porovnány relativní velikosti píků náležejících těmto peptidům (ukázka je na Obr. 4.7).

Výsledky určení izoform PsbO a jejich variant jsou v Tab. 4.2. Nepodařilo se rozlišit izoformy PsbO1a a PsbO1c. Rozdílové peptidy (YTAK v PsbO1a a YTANK v PsbO1c) mají pravděpodobně příliš nízkou hmotnost. I když byl hmotnostní spektrometr nastaven, aby měřil i takto nízké hodnoty, ve spektrech nebyly nalezeny dostatečně výrazné píky náležející těmto peptidům.

Z výsledků je rovněž vidět, že jednotlivé izoformy nebyly soustředěné pouze do daných spotů, ale byly zřejmě částečně rozptýlené v okolí a kontaminovaly okolní spoty. Ve většině případů se však podařilo určit, která izoforma byla pravděpodobně v daném spotu hlavní.

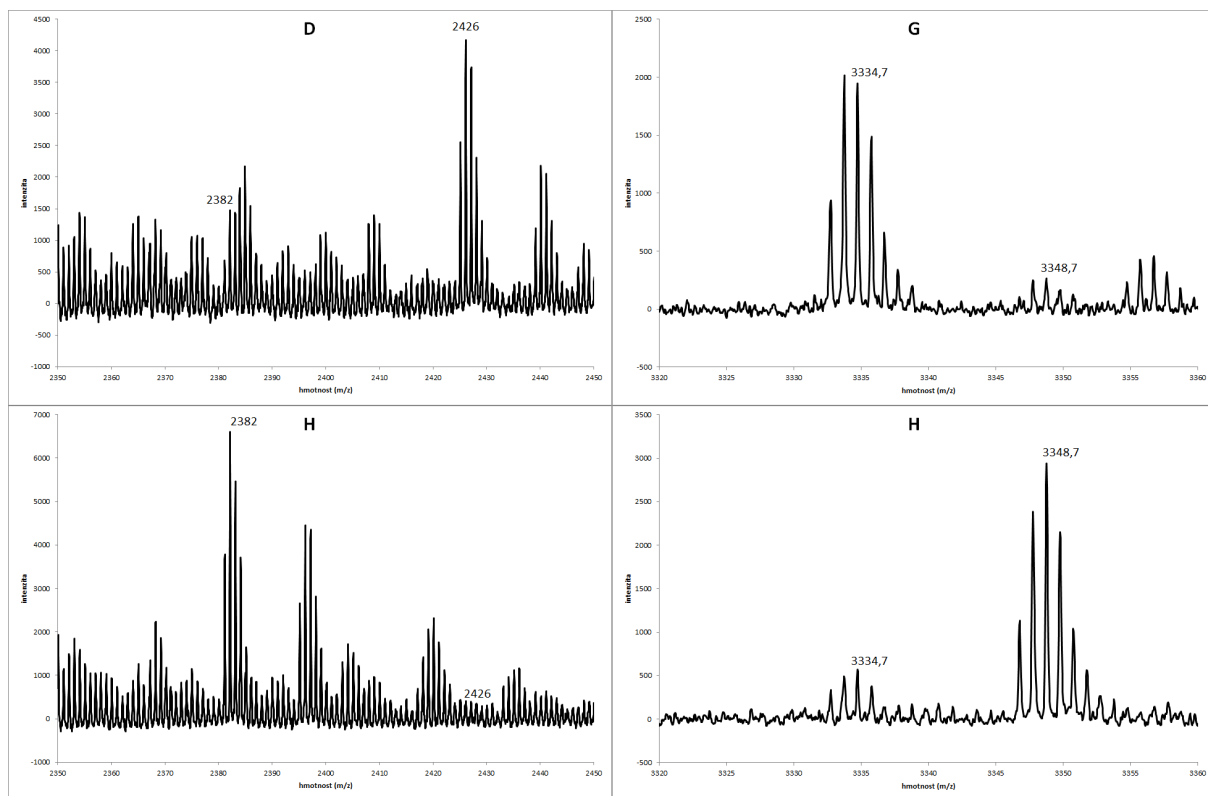
Čtyři nejsilnější spoty (E, F, G a H) byly přiřazeny ke čtyřem známým variantám izoform PsbO. Jejich rozložení na 2D gelu odpovídá i teoretickým izoelektrickým bodům (Tab. 4.1) – PsbO1c má nejnižší izoelektrický bod, následuje PsbO2, PsbO1b a nejvyšší má PsbO1a.



Obr. 4.6: Detail gelu z 2D IEF-SDS PAGE tylakoidů bramboru (Obr. 4.5). **a** - výřez z Obr. 4.5. **b** - výřez se zvětšeným kontrastem pro zvýraznění minoritních spotů. Jednotlivé spoty jsou označeny A-J. Spoty B a C a spoty G a H splývají.

Tab. 4.1: Teoretické izoelektrické body a molekulové hmotnosti izoform PsbO a jejich variant.

izoforma PsbO	pI	molekulová hmotnost (průměrná; Da)
1a	5,10	26613,96
1b	5,09	26599,93
1c	5,01	26599,89
2	5,07	26763,03



Obr. 4.7: Ukázka porovnávání hmotnostních spekter. Levá část – porovnání velikosti píku specifického pro PsbO1 (2382 Da) a píku specifického pro PsbO2 (2426 Da) ve spektrech spotů D a H. Je vidět, že ve spotu D se nachází převážně izoforma PsbO2, ale trochu i PsbO1. Ve spotu H se nachází pouze izoforma PsbO1. Pravá část – porovnání velikosti píku specifického pro PsbO1b (3334,7 Da) a píku specifického pro PsbO1a/c (3348,7 Da) ve spektrech spotů G a H. Ve spotu G se nachází především izoforma PsbO1b, ve spotu H především PsbO1a/c.

Tab. 4.2: Výsledky určení izoform PsbO v jednotlivých spotech na gelu pomocí hmotnostní spektrometrie.

spot	identifikace L. Fischera	nalezeno	vyloučeno	předpokládaná hlavní izoforma ve spotu
A		1a/c i 2	1b	?
B		1 i 2		2
C		1a/c	1b	1a/c
D		především 2, trochu 1a/c	1b	2
E	1c	špatné spektrum		1c
F	2	2		2
G	1b	především 1b, trochu 1a/c a 2		1b
H	1a	především 1a/c, trochu 1b		1a
I		především 2, trochu 1		2
J		především 2, trochu 1		2

4.3 Exprese *psbO* v *E. coli* a následná purifikace a analýzy rekombinantního proteinu

4.3.1 Popis a uspořádání experimentu

Pro podrobné *in vitro* funkční analýzy jednotlivých izoform PsbO je třeba PsbO exprimovat heterologně. Heterologní exprese umožňuje získání relativně velkého množství čistého, dobře definovaného proteinu. Vzhledem k tomu, že PsbO nemá žádné známé posttranslační modifikace kromě jednoho S-S můstku, zvolili jsme pro tento účel bakteriální expresní systém.

Použitý expresní a purifikační protokol je založen na kurzu „Practical Course on Rapid Cloning, Protein Expression and Purification“, který na Umeå University vede Gunter Stier. Žádaný protein je exprimován ve fúzi s nosičovým proteinem s His-tagem, se kterým je spojen specifickým místem pro TEV proteázu. Pomocí afinitní chromatografie na niklové kolonce je fúzní protein izolován. Z žádaného proteinu je odštěpen TEV proteázou His-tagem značený nosičový protein a odstraněn při druhé afinitní chromatografii na niklové kolonce. Finální vyčištění proteinu od nečistot je zajištěno gelovou filtrací.

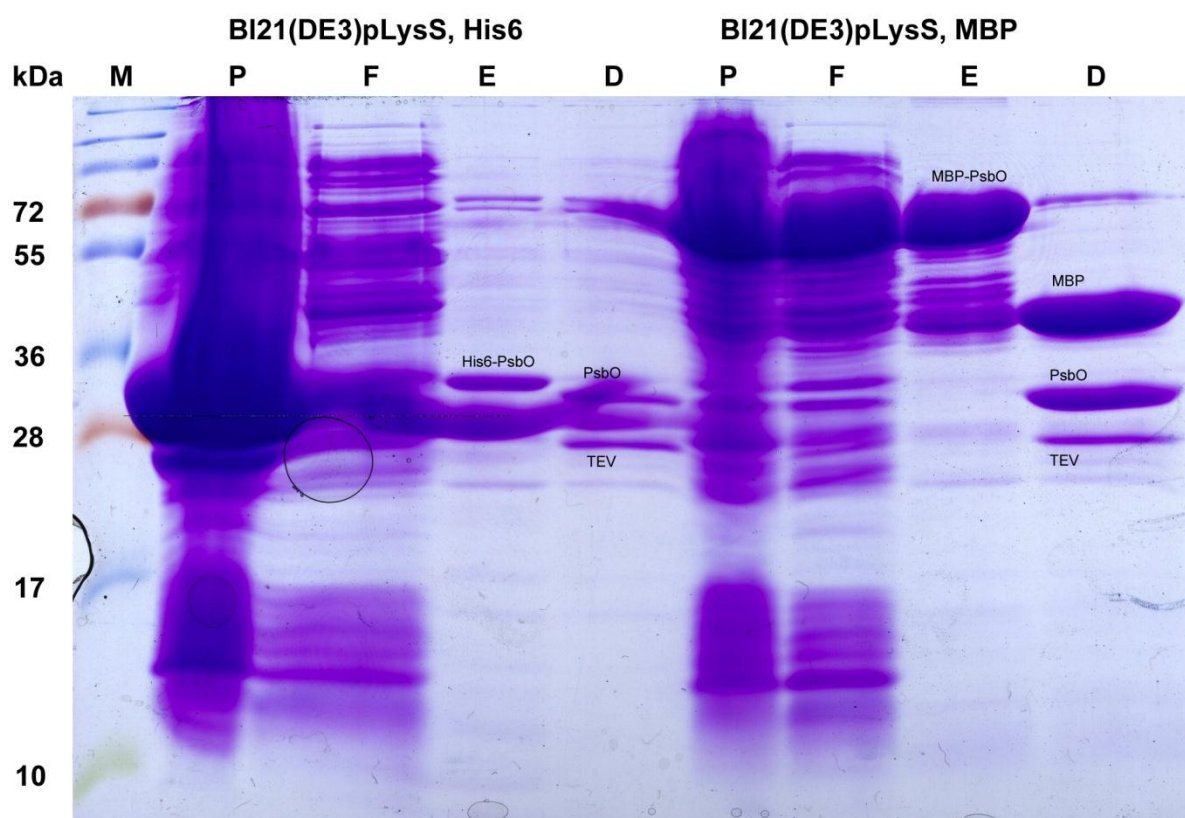
V rámci této diplomové práce byla optimalizována exprese PsbO ze špenátu v *E. coli*. Experimenty byly prováděny jako součást stáže v laboratoři profesora Görana Samuelssona v Umeå Plant Science Center ve Švédsku. Využity byly expresní vektory s vloženým genem *psbO*, které připravil Jan Karlsson (Umeå Plant Science Center, Švédsko). Nejprve byla provedena exprese a purifikace v malém měřítku, při které byly otestovány různé kombinace nosičového proteinu a expresního kmene *E. coli*. Použité nosičové proteiny jsou uvedeny v Tab. 3.12. Vybraná kombinace byla opakovaně exprimována ve větším měřítku a při purifikacích byly optimalizovány různé proměnné (množství Ni-agarózy v kolonce, složení promývacích roztoků, množství TEV proteázy, podmínky digesce, podmínky gelové filtrace a podobně). Nakonec byla přítomnost proteinu o správné hmotnosti potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie. Správné sbalení proteinu, podmíněné vytvořeným S-S můstkem (Tanaka *et al.* 1989), bylo ověřeno CD spektrometrií.

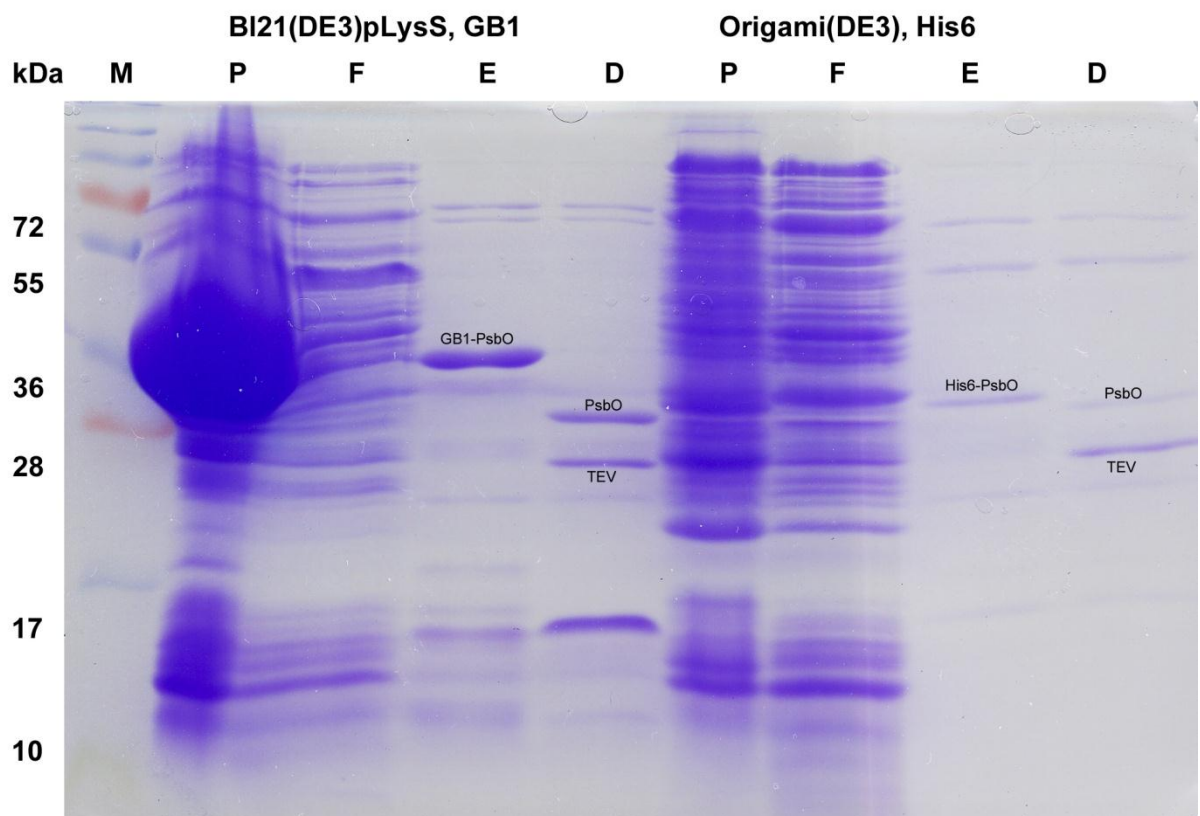
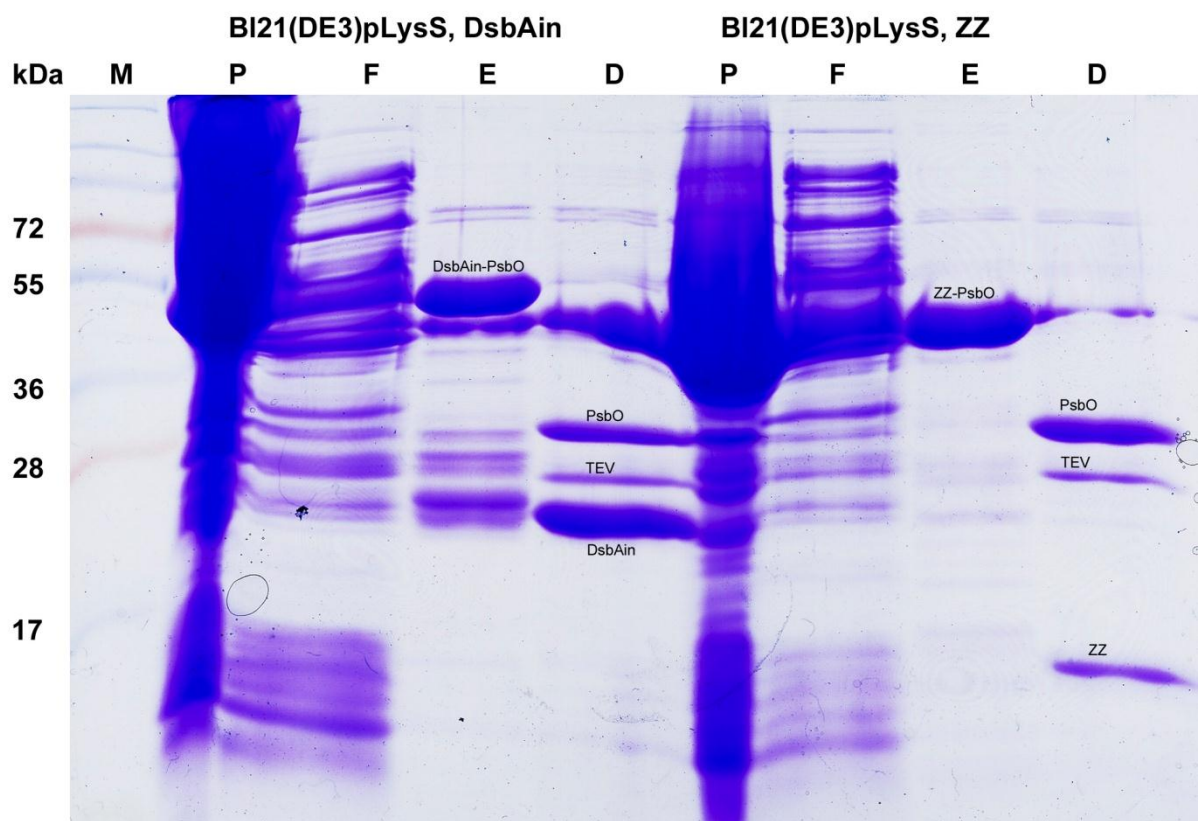
4.3.2 Výsledky

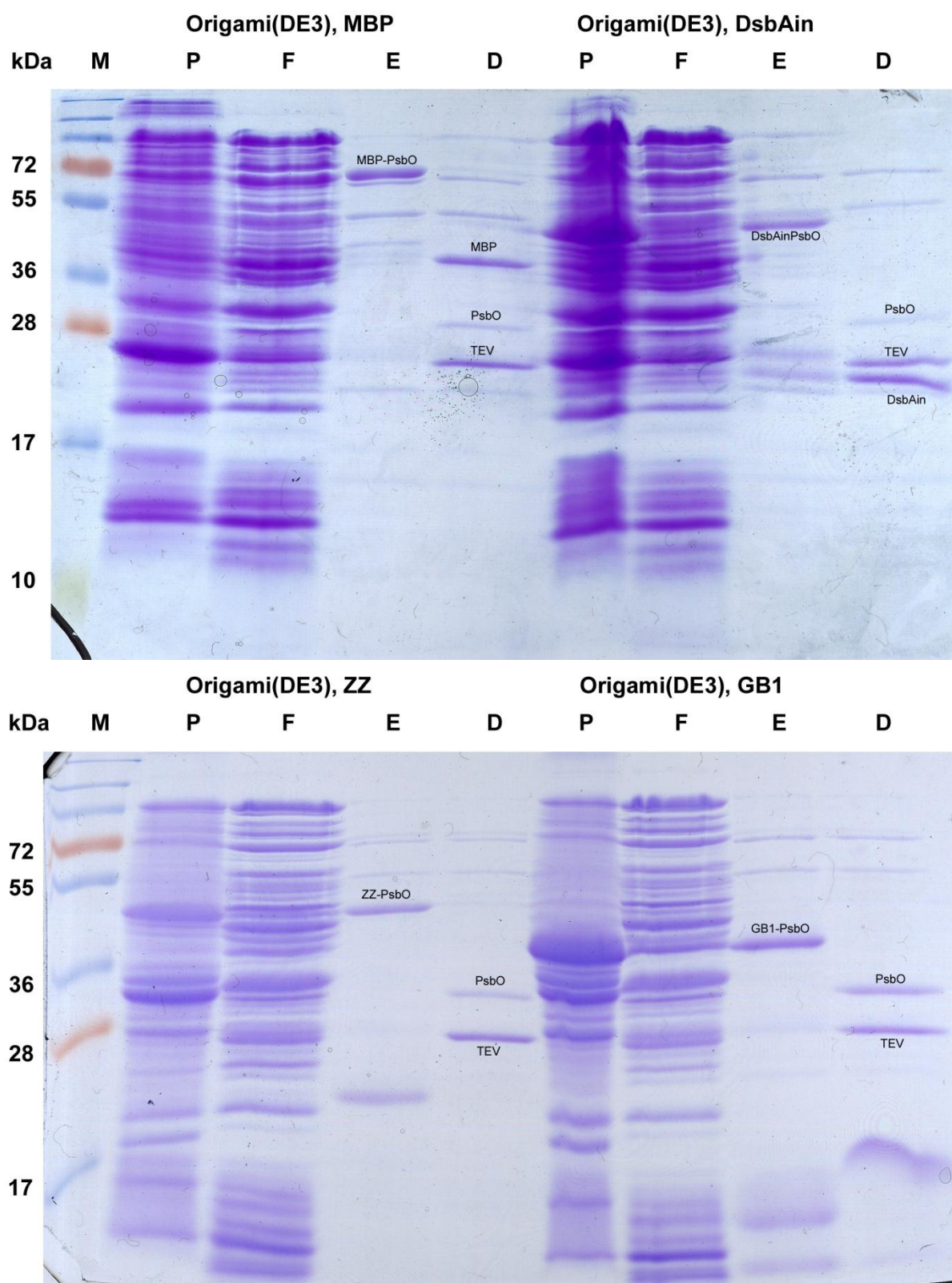
4.3.2.1 Testovací exprese a purifikace v malém měřítku

Pro testovací expresi a purifikaci v malém měřítku byly použity dva různé expresní kmeny *E. coli* a pět různých nosičových proteinů (tedy deset různých kombinací). Jak je vidět z Obr. 4.8, ve všech případech byl exprimován alespoň částečně rozpustný fúzní protein, který se vázal na Ni-agarózu. Výrazně se však lišilo množství exprimovaného proteinu. Znatelně vyšší míra exprese byla pozorována u kmene BL21(DE3)pLysS, což mělo za následek i vyšší koncentraci fúzního proteinu v eluátu. Velké množství fúzního proteinu v sedimentu

pravděpodobně nebylo způsobeno výskytem v inkluzních těliscích, ale nedokonalým rozbitím buněk (při expresi ve velkém měřítku byla použita účinnější metoda rozbití buněk a obsah fúzního proteinu v sedimentu se snížil). Štěpení TEV proteázou proběhlo u všech kombinací s vysokou účinností – zbytek fúzního proteinu v eluátu po digesci je slabě patrný jen v několika případech a může to být i kontaminace z vedlejšího vzorku při SDS-PAGE.







Obr. 4.8: Gely z SDS-PAGE – purifikace PsbO v malém měřítku s různými kombinacemi expresního kmene a nosičového proteinu. Kmen *E. coli* a nosičový protein jsou označeny nad každou polovinou gelu. M – marker, P – peletka (sediment z centrifugace po rozbití buněk, resuspendován v lyzačním pufru), F – flowthrough (tekutina prošlá kolonkou s Ni-agarózou po několikerém opětovném nanesení supernatantu – frakce s rozpustnými proteiny nenavázanými na kolonku), E – eluát (proteiny eluované z kolonky elučním pufrům obsahujícím 340mM imidazol), D – eluát po digesci TEV proteázou. Gely byly obarveny Coomassie Brilliant Blue.

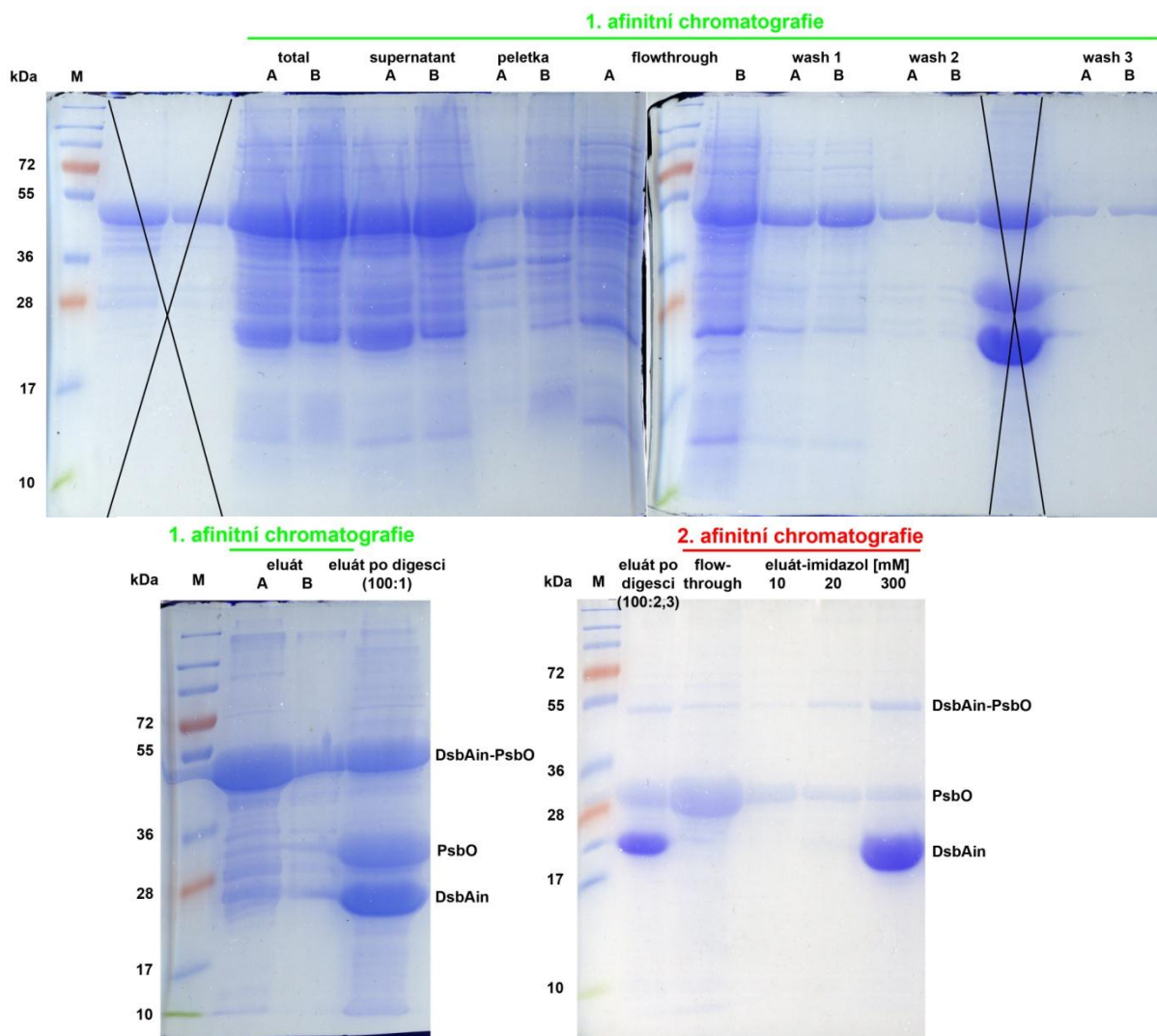
4.3.2.2 Výběr vhodného expresního kmene a nosičového proteinu

Původně bylo k expresi plánováno použití kmene Origami(DE3), který má inaktivované geny pro thioredoxin reduktázu a glutathion reduktázu, což má za následek méně redukční prostředí v cytoplazmě, které je vhodnější k tvorbě S-S můstků (Derman *et al.* 1993; Prinz *et al.* 1997). Avšak vzhledem k tomu, že kmen BL21(DE3)pLysS rostl mnohem rychleji a exprimoval více fúzního proteinu, byla nakonec zvolena kombinace kmene BL21(DE3)pLysS a nosičového proteinu DsbAin. Nosič DsbAin (zkrácená varianta DsbA) je také vhodný pro expresi proteinů, u kterých se má vytvořit S-S můstek, protože se jedná o bakteriální disulfid oxidoreduktázu, která katalyzuje tvorbu S-S můstků (Bardwell *et al.* 1991).

4.3.2.3 Exprese a purifikace ve velkém měřítku

Kombinace kmene BL21(DE3)pLysS a nosičového proteinu DsbAin byla použita pro expresi a purifikaci ve velkém měřítku (kultura o objemu 1 l). Purifikační protokol byl postupně optimalizován (z pufrů byl vyloučen β -merkaptoethanol, bylo zvýšeno množství Ni-agarózy v kolonce, byly upraveny podmínky digesce TEV proteázou a podobně). Konečný protokol viz kap. 3.4.

Pomocí optimalizovaného postupu purifikace bylo z 1 l expresní kultury získáno až 100 mg PsbO lehce znečištěného nedoštěpeným zbytkem fúzního proteinu (množství po druhé afinitní chromatografii, při které se odstraňuje nosičový protein). Gel z SDS-PAGE průběžných vzorků purifikace je na Obr. 4.9. Z neznámého důvodu se množství nosičového proteinu na gelech jeví znatelně větší, než množství PsbO.

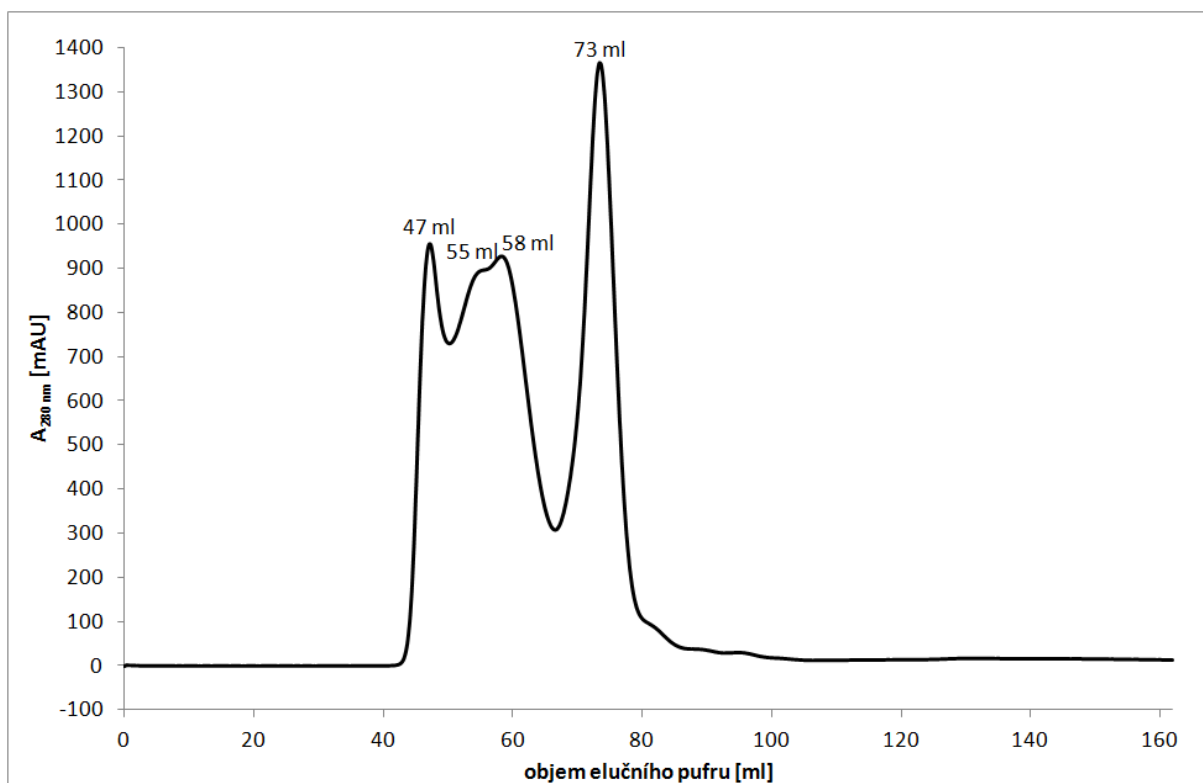


Obr. 4.9: SDS-PAGE gely průběžných vzorků z purifikace PsbO z 2x 0,5 l expresní kultury kmene BI21(DE3)pLysS exprimujícího PsbO ve fúzi s DsbAin. Purifikace byla prováděna na 2 kolonkách (A, B), z nichž každá obsahovala 6 ml Ni-agarózy. M – marker, total – výchozí vzorek (buňky po rozbití), peletka – sediment z centrifugace po rozbití buněk, flowthrough – tekutina prošlá kolonkou s Ni-agarózou po několikerém opětovném nanesení supernatantu, wash 1–3 – tekutina prošlá kolonkou při promytí promývacím roztokem 1–3, eluát – proteiny eluované z kolonky elučním pufrém (obsahujícím 340mM imidazol), eluát po digesti – eluát z 1. afinitní chromatografie po štěpení TEV proteázou (poměr v závorce označuje hmotnost proteinů v eluátu ku hmotnosti TEV proteázy). Hodnoty u eluátu z 2. afinitní chromatografie označují koncentraci imidazolu v pufru A použitém k eluci. Gely byly obarveny Coomassie Brilliant Blue.

4.3.2.4 Gelová filtrace

Závěrečné přečištění proteinu bylo provedeno pomocí gelové filtrace. V chromatogramu (Obr. 4.10) jsou 4 hlavní píky kolem těchto pozic: 47 ml, 55 ml, 58 ml a 73 ml. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (výsledky nejsou ukázány). Pík na pozici 73 ml obsahuje tam, kde se nepřekrývá s vedlejším píkem, čistý PsbO. Jedná se pravděpodobně o pík monomeru PsbO (26,81 kDa). Zbylé tři píky podle SDS-PAGE obsahují jak PsbO, tak nerozštěpený fúzní protein. Vzhledem k tomu, že se překrývají, nejde určit, který konkrétně náleží čemu. Je ale pravděpodobné, že píky na pozici 55 ml a 58 ml jsou tvořeny dimerem

PsbO (53,62 kDa) a fúzním proteinem (50,58 kDa). Pík na pozici 47 ml pravděpodobně náleží nějakému většímu oligomeru PsbO nebo PsbO a fúzního proteinu.

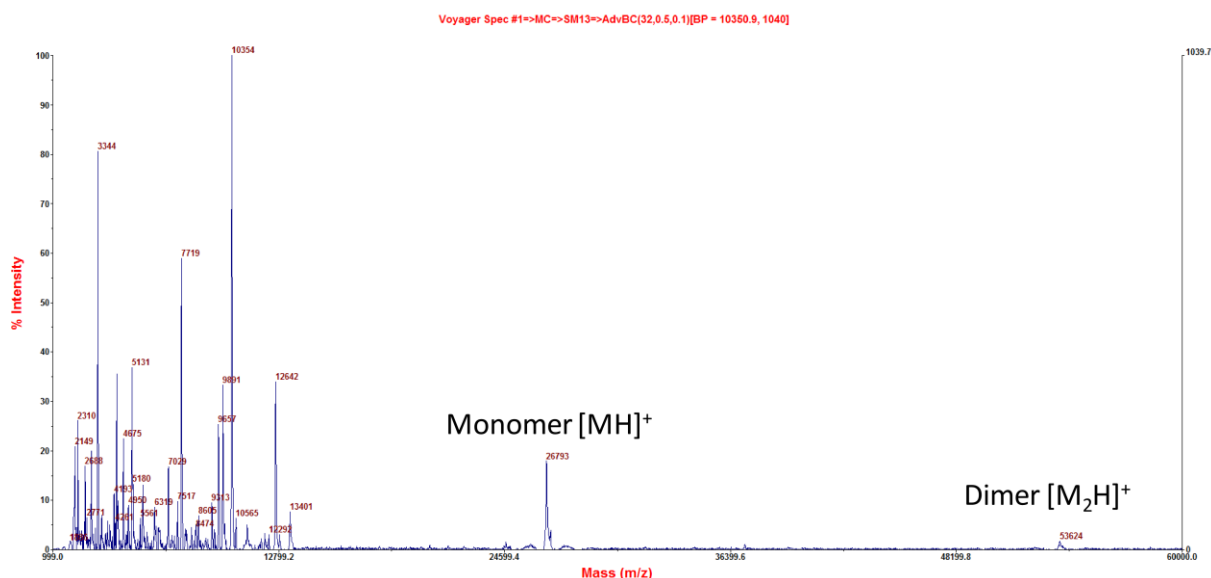


Obr. 4.10: Chromatogram z gelové filtrace PsbO izolovaného z *E. coli* (po odstranění nosičového proteinu). Množství proteinů v eluátu bylo zjišťováno pomocí absorbance při 280 nm.

4.3.2.5 Hmotnostní spektrometrie

Centrální frakce píků (pro píky na 55 a 58 ml dohromady) byly analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (byla měřena hmotnost celých, neštěpených proteinů). Jak PsbO, tak fúzní protein jsou však pravděpodobně špatně ionizovatelné pomocí metody MALDI. Ve frakci kolem 47 ml nebylo nalezeno nic. Ve frakci mezi píky na 55 a 58 ml i ve frakci kolem 73 ml byly nalezeny slabé signály proteinů o hmotnostech 26,8 kDa a 53,6 kDa, což odpovídá monomeru a dimeru PsbO (26,81 kDa a 53,62 kDa; Obr. 4.11).

V hmotnostních spektrech vybraných frakcí gelové filtrace provedené s celým neštěpeným fúzním proteinem (chromatogram není ukázán) nebylo nalezeno nic. Fúzní protein je pravděpodobně ještě obtížněji ionizovatelný než samotný PsbO, a proto nebyl hmotnostním spektrem detekován.

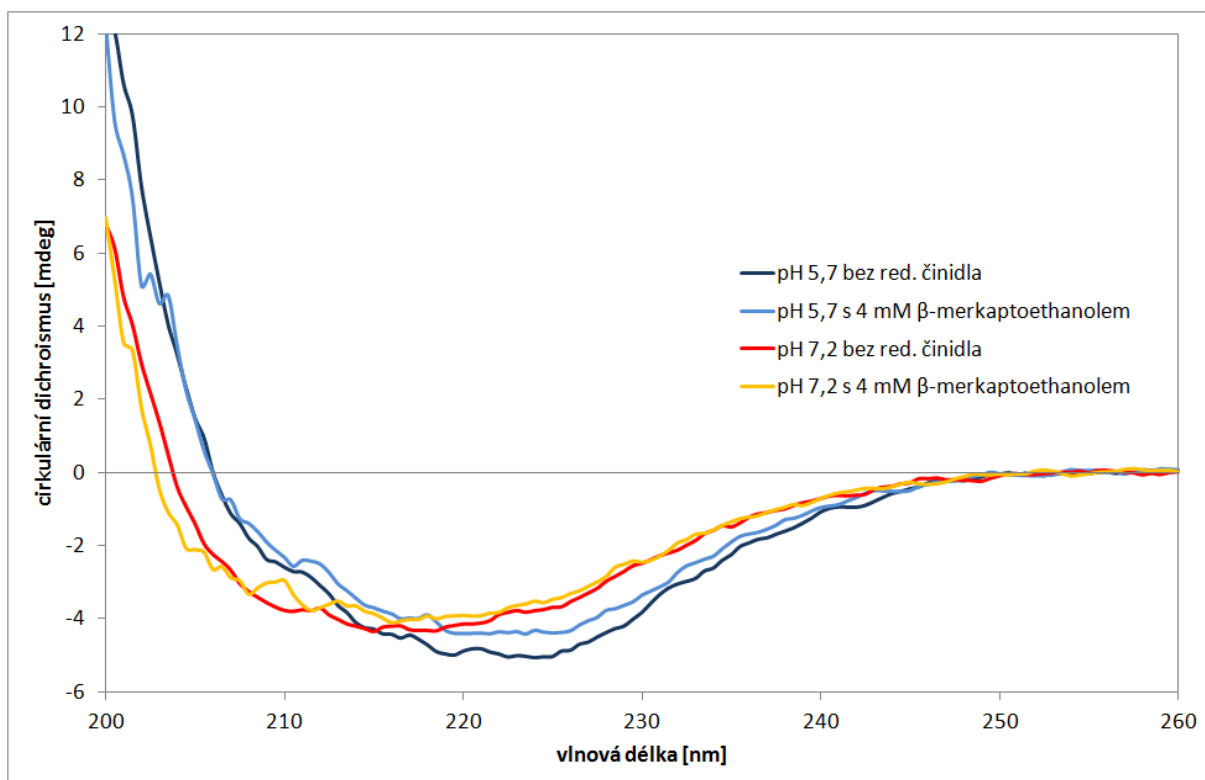


Obr. 4.11: Hmotnostní spektrum frakce kolem 73 ml z gelové filtrace.

4.3.2.6 CD spektrometrie

Frakce z gelové filtrace, které podle SDS-PAGE obsahovaly čistý PsbO (přibližně mezi pozicemi 70 ml a 80 ml), byly smíchány. Správné sbalení proteinu, které je závislé na vytvořeném disulfidickém můstku, bylo ověřováno pomocí CD spektrometrie. CD spektra byla měřena při dvou různých hodnotách pH (5,7 a 7,2) a ve variantách bez redukčního činidla a s redukčním činidlem (4mM β -merkaptoethanol). Porovnáním variant bez redukčního činidla a s redukčním činidlem se mělo ověřit, že PsbO má bez přidání redukčního činidla vytvořený S-S můstek, který se po přidání β -merkaptoethanolu zredukuje, což zapříčiní změnu konformace a tedy i CD spektra. Jak je vidět z Obr. 4.12, spektrum se po přidání redukčního činidla nijak znatelně nezměnilo. Porovnání s publikovanými spektry (Tanaka *et al.* 1989; Shutova *et al.* 1997; Weng *et al.* 2004) však ukazuje, že všechna naměřená spektra náleží sbalenému PsbO s vytvořeným S-S můstkem. Více viz v Diskuzi.

Spektra naměřená při různých hodnotách pH se od sebe částečně liší, což může být způsobeno částečně odlišnou konformací. Z Obr. 4.12 je vidět, že při pH 5,7 má spektrální křivka minimum kolem 225 nm a při pH 7,2 kolem 215 nm.



Obr. 4.12: CD spektra purifikovaného PsbO exprimovaného v *E. coli* při různých hodnotách pH a ve variantách bez redukčního činidla a s redukčním činidlem. Spektra byla měřena při teplotě 20 °C, koncentrace proteinu byla 0,3 mg/ml. Redukční činidlo bylo přidáno několik minut před měřením.

4.4 Bioinformatické analýzy

4.4.1 Porovnání kódujících a aminokyselinových sekvencí genů *psbO* vybraných druhů rostlin

4.4.1.1 Popis a uspořádání experimentu

Fenotypové odchylky pozorované u mutantní linie bramboru s chybějící izoformou PsbO a popsané rozdíly ve funkci dvou izoform PsbO huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) vyústily v otázku, jak je tomu s počtem a funkční rozrůzněností izoform u ostatních druhů rostlin. Jako výchozí způsob získání informací o PsbO jiných rostlin byla zvolena bioinformatická analýza dat uložených ve veřejných databázích.

Sekvence PsbO byly vyhledávány u druhů s dostatečným množstvím sekvenčních informací dostupných v databázích. Prohledávány byly především sekvence PUT (PlantGDB-assembled unique transcripts, contigy složené ze sekvencí EST) z databáze PlantGDB. Některé sekvence byly poskládány v programu Geneious ze sekvencí EST vyhledaných v databázi NCBI. Třetím zdrojem sekvencí byly referenční RNA sekvence databáze NCBI. Podrobnosti jsou uvedeny v Metodice.

Sekvence byly zarovnány a byl z nich vytvořen celkový fylogenetický strom.

4.4.1.2 Výsledky

Z databází bylo získáno 78 sekvencí mRNA kódující PsbO z 36 druhů rostlin ze 14 čeledí (Tab. 4.3). U všech dvouděložných rostlin, u kterých byly vyhledány sekvence, kromě špenátu (*Spinacia oleracea*), byly nalezeny minimálně dvě exprimované izoformy PsbO. Navíc není jisté, že špenát exprimuje pouze jednu izoformu, v databázích nejsou dostupné téměř žádné EST sekvence špenátu, takže přítomnost pouze jedné izoformy na úrovni mRNA nelze ověřit.

Z 25 druhů dvouděložných rostlin 18 exprimuje právě dvě izoformy PsbO. Tři druhy (*Nicotiana tabacum*, *Brassica rapa* a *Glycine max*) exprimují 4 izoformy PsbO. Pro brukev zelnou (*Brassica oleracea*) byly nalezeny 3 sekvence a pro brukev řepku (*Brassica napus*) 5 sekvencí, což není tak překvapivé, protože brukev řepka (*B. napus*) má allopolyploidní genom složený z genomů brukve zelné (*B. oleracea*) a brukve řepáku (*B. rapa*; (Iniguez-Luy & Federico 2011)). Pro řeřišničník (*Arabidopsis lyrata*) byly nalezeny 3 izoformy. V databázích však nejsou dostupné téměř žádné sekvence EST řeřišničníku, nalezené sekvence jsou predikce mRNA podle genomových sekvencí. Dvě z těchto izoform se velmi podobají dvěma izoformám exprimovaným v blízce příbuzném huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), třetí (*Arabidopsis_lyrata_3_gi|297798197|ref|XM_002866937.1|*) je poměrně odlišná a má přibližně o 30 aminokyselin kratší signální peptid. Je tedy možné, že se jedná pouze o pseudogen, který není exprimován.

Nalezené sekvence PsbO tolíce (*Medicago truncatula*) jsou rovněž predikce mRNA podle genomových sekvencí, ale data z EST databáze potvrzují expresi obou těchto izoform.

V rámci jednoděložných rostlin byly nalezeny sekvence PsbO zástupců pouze dvou čeledí – lipnicovité (*Poaceae*) a zázvorníkovité (*Zingiberaceae*). Oba zástupci zázvorníkovitých exprimují po dvou izoformách PsbO. Z lipnicovitých pouze u kukuřice (*Zea mays*) byly nalezeny dvě izoformy. Pšenice (*Triticum aestivum*), ječmen (*Hordeum vulgare*) i rýže (*Oryza sativa*) exprimují pravděpodobně pouze jednu izoformu – nebyly u nich nalezeny žádné sekvence EST náležející jiné izoformě PsbO. Rýže, která má již plně osekvenovaný genom, má navíc i v genomu pouze jednu izoformu PsbO.

Z nahosemenných rostlin byly nalezeny sekvence pouze u tří zástupců čeledi borovicovité (*Pinaceae*). Všechny tyto tři stromy – borovice lesní (*Pinus sylvestris*), borovice kadidlová (*Pinus taeda*) a smrk sitka (*Picea sitchensis*) exprimují pravděpodobně pouze jednu izoformu, mezi EST sekvencemi těchto druhů nebyly nalezeny žádné sekvence náležející jiné izoformě PsbO.

U vranečku (*Selaginella moellendorffii*) byly nalezeny dvě izoformy, z nichž jedna (PUT-165a-Selaginella_moellendorffii-12671) je velice odlišná od všech ostatních nalezených sekvencí. Obsahuje delší delece a inserce, zatímco u ostatních sekvencí,

nepočítáme-li sekvence signálních peptidů, se vyskytují pouze výjimečně jednoaminokyselinové delece. Sekvencí EST náležejících této izoformě se v databázi nachází mnohem méně než sekvencí EST kódujících druhou izoformu podobnou ostatním PsbO, lze tedy předpokládat, že je exprimovaná v menší míře. Vzhledem k tomu, že obě izoformy PsbO vranečku mají příliš málo konzervovanou sekvenci v místě odštěpování signálního peptidu, takže není možné přesně podle podobnosti s ostatními sekvencemi odlišit signální peptid od maturovaného proteinu, nebyly zahrnuty do většiny fylogenetických analýz.

Mech čepinka odstálá (*Physcomitrella patens*) exprimuje 4 izoformy PsbO.

Tab. 4.3: Sekvence mRNA kódující PsbO vyhledané v databázích. Název druhu, ze kterého sekvence pochází, je obsažen v názvu sekvence. Zdroje sekvencí: PlantGDB - Plant Genome Database (<http://plantgdb.org>), NCBI EST - sekvence poskládané z EST databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>), NCBI refseq_rna - databáze referenčních RNA sekvencí NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>). Podrobnosti jsou uvedeny v Metodice.

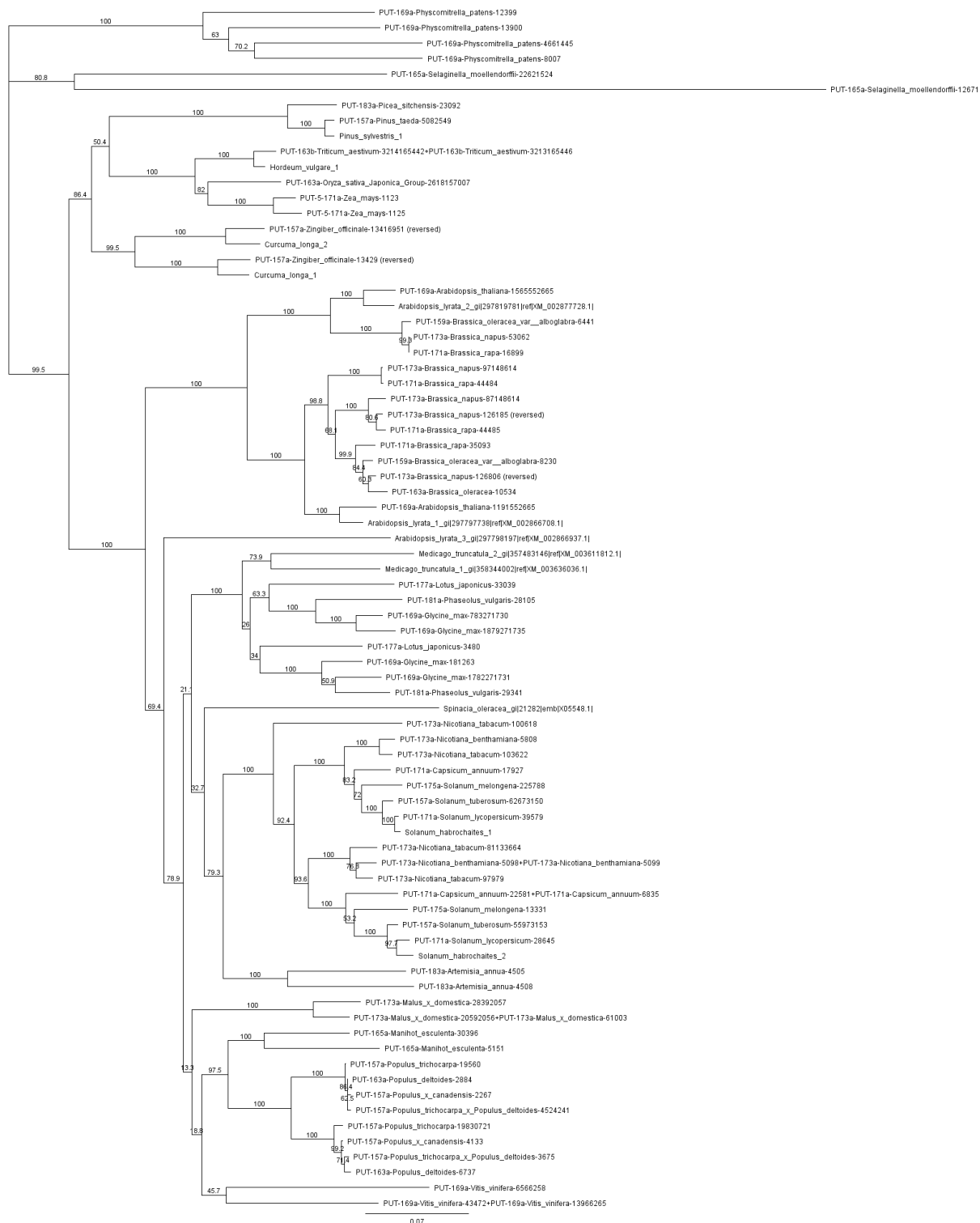
čeleď	sekvence	zdroj
<i>Solanaceae</i>	PUT-171a-Solanum_lycopersicum-28645	PlantGDB
	PUT-171a-Solanum_lycopersicum-39579	PlantGDB
	PUT-157a-Solanum_tuberosum-62673150	PlantGDB
	PUT-157a-Solanum_tuberosum-55973153	PlantGDB
	Solanum_habrochaites_1	NCBI EST
	Solanum_habrochaites_2	NCBI EST
	PUT-175a-Solanum_melongena-225788	PlantGDB
	PUT-175a-Solanum_melongena-13331	PlantGDB
	PUT-171a-Capsicum_annuum-17927	PlantGDB
	PUT-171a-Capsicum_annuum-22581+PUT-171a-Capsicum_annuum-6835	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_benthiana-5808	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_benthiana-5098+PUT-173a-Nicotiana_benthiana-5099	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_tabacum-103622	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_tabacum-97979	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_tabacum-81133664	PlantGDB
	PUT-173a-Nicotiana_tabacum-100618	PlantGDB
<i>Brassicaceae</i>	PUT-169a-Arabidopsis_thaliana-1565552665	PlantGDB
	PUT-169a-Arabidopsis_thaliana-1191552665	PlantGDB
	Arabidopsis_lyrata_1_gi 297797738 ref XM_002866708.1	NCBI refseq_rna
	Arabidopsis_lyrata_2_gi 297819781 ref XM_002877728.1	NCBI refseq_rna
	Arabidopsis_lyrata_3_gi 297798197 ref XM_002866937.1	NCBI refseq_rna
	PUT-173a-Brassica_napus-126806	PlantGDB
	PUT-173a-Brassica_napus-126185	PlantGDB
	PUT-173a-Brassica_napus-97148614	PlantGDB
	PUT-173a-Brassica_napus-87148614	PlantGDB
	PUT-173a-Brassica_napus-53062	PlantGDB
	PUT-171a-Brassica_rapa-35093	PlantGDB
	PUT-171a-Brassica_rapa-44485	PlantGDB
	PUT-171a-Brassica_rapa-44484	PlantGDB
	PUT-171a-Brassica_rapa-16899	PlantGDB
	PUT-159a-Brassica_oleracea_var__alboglabra-8230	PlantGDB
	PUT-159a-Brassica_oleracea_var__alboglabra-6441	PlantGDB
	PUT-163a-Brassica_oleracea-10534	PlantGDB
<i>Salicaceae</i>	PUT-157a-Populus_trichocarpa-19560	PlantGDB
	PUT-157a-Populus_trichocarpa-19830721	PlantGDB
	PUT-157a-Populus_x_canadensis-2267	PlantGDB
	PUT-157a-Populus_x_canadensis-4133	PlantGDB

	PUT-157a-Populus_trichocarpa_x_Populus_deltoides-4524241	PlantGDB
	PUT-157a-Populus_trichocarpa_x_Populus_deltoides-3675	PlantGDB
	PUT-163a-Populus_deltoides-2884	PlantGDB
	PUT-163a-Populus_deltoides-6737	PlantGDB
<i>Fabaceae</i>	Medicago_truncatula_2_gi 357483146 ref XM_003611812.1	NCBI refseq_rna
	Medicago_truncatula_1_gi 358344002 ref XM_003636036.1	NCBI refseq_rna
	PUT-169a-Glycine_max-783271730	PlantGDB
	PUT-169a-Glycine_max-1782271731	PlantGDB
	PUT-169a-Glycine_max-1879271735	PlantGDB
	PUT-169a-Glycine_max-181263	PlantGDB
	PUT-177a-Lotus_japonicus-3480	PlantGDB
	PUT-177a-Lotus_japonicus-33039	PlantGDB
	PUT-181a-Phaseolus_vulgaris-28105	PlantGDB
	PUT-181a-Phaseolus_vulgaris-29341	PlantGDB
<i>Euphorbiaceae</i>	PUT-165a-Manihot_esculenta-30396	PlantGDB
	PUT-165a-Manihot_esculenta-5151	PlantGDB
<i>Asteraceae</i>	PUT-183a-Artemisia_annua-4505	PlantGDB
	PUT-183a-Artemisia_annua-4508	PlantGDB
<i>Rosaceae</i>	PUT-173a-Malus_x_domestica-28392057	PlantGDB
	PUT-173a-Malus_x_domestica-20592056+PUT-173a-Malus_x_domestica-61003	PlantGDB
<i>Vitaceae</i>	PUT-169a-Vitis_vinifera-6566258	PlantGDB
	PUT-169a-Vitis_vinifera-43472+PUT-169a-Vitis_vinifera-13966265	PlantGDB
<i>Amaranthaceae</i>	Spinacia_oleracea_gi 21282 emb X05548.1	NCBI refseq_rna
<i>Poaceae</i>	Hordeum_vulgare_1	NCBI EST
	PUT-163b-Triticum_aestivum-3214165442+PUT-163b-Triticum_aestivum-3213165446	PlantGDB
	PUT-163a-Oryza_sativa_Japonica_Group-2618157007	PlantGDB
	PUT-5-171a-Zea_mays-1123	PlantGDB
	PUT-5-171a-Zea_mays-1125	PlantGDB
<i>Zingiberaceae</i>	PUT-157a-Zingiber_officinale-13416951	PlantGDB
	PUT-157a-Zingiber_officinale-13429	PlantGDB
	Curcuma_longa_1	NCBI EST
	Curcuma_longa_2	NCBI EST
<i>Pinaceae</i>	Pinus_sylvestris_1	NCBI EST
	PUT-157a-Pinus_taeda-5082549	PlantGDB
	PUT-183a-Picea_sitchensis-23092	PlantGDB
<i>Selaginellaceae</i>	PUT-165a-Selaginella_moellendorffii-22621524	PlantGDB
	PUT-165a-Selaginella_moellendorffii-12671	PlantGDB
<i>Funariaceae</i>	PUT-169a-Physcomitrella_patens-4661445	PlantGDB
	PUT-169a-Physcomitrella_patens-8007	PlantGDB
	PUT-169a-Physcomitrella_patens-12399	PlantGDB
	PUT-169a-Physcomitrella_patens-13900	PlantGDB

Vyhledané sekvence PsbO jsou relativně hodně konzervované. Mezi zarovnanými aminokyselinovými sekvencemi maturovaného proteinu (bez signálního peptidu) vyšších rostlin (vyhledané sekvence bez čepenky a vranečku) je 58 % pozic zcela konzervovaných.

Fylogenetický strom vytvořený z kódujících sekvencí *psbO* (Obr. 4.13) má netypickou topologii. Na jednotlivé vzájemně paralogní izoformy se neštěpí u báze, jak by se dalo očekávat, ale spíše až na koncích jednotlivých větví, na úrovni čeledí či ještě nižších taxonomických jednotek. Podobnost izoform v rámci druhu je patrná i z aminokyselinových sekvencí maturovaného PsbO (bez signálního peptidu). Nepočítáme-li podivné sekvence řeřišničníku a vranečku (*Arabidopsis lyrata_3_gi|297798197|ref|XM_002866937.1|* a

PUT-165a-Selaginella_moellendorffii-12671), liší se dvě sekvence jednoho druhu maximálně ve 23 (*Populus deltoides* a *Populus* × *canadensis*), respektive ve 24 (*Physcomitrella patens*) aminokyselinách.



Obr. 4.13: Fylogenetický strom všech vyhledaných kódujících sekvencí PsbO. Strom byl vytvořen z nukleotidových sekvencí v programu Geneious Pro 5.6.4 (Biomatters) metodou Neighbor-Joining. U jednotlivých větví jsou uvedeny bootstrapové hodnoty. Měřítka označuje počet substitucí na jednu pozici.

Z topologie stromu dále stojí za povšimnutí, že nahosemenné rostliny a jednoděložné rostliny byly přiřazeny do stejné větve. Zajímavé je také netypická sekvence řeřišničníku (*Arabidopsis lyrata_3_gi|297798197|ref|XM_002866937.1|*), která nebyla zařazena mezi ostatní brukvovité, ale k ostatním dvouděložným rostlinám.

4.4.2 Hledání rozdílů mezi izoformami (mezi druhy a v rámci druhů)

4.4.2.1 Popis a uspořádání experimentu

Od neobvyklé topologie fylogenetického stromu sekvencí PsbO byly odvozeny dvě hypotézy možné evoluce izoform PsbO⁵:

Hypotéza 1 (nedávná duplikace): Duplikace PsbO proběhla v evoluci poměrně nedávno a nezávisle na sobě u předků mnoha skupin. Po duplikaci si dceřinné izoformy podržely *druhově specifické úseky* (typické pro jednotlivé skupiny rostlin) a divergovaly v úsecích ovlivňujících funkci proteinu (*funkčně specifické úseky*).

Hypotéza 2 (dávná duplikace): Duplikace PsbO proběhla v evoluci velmi dávno a izoformy divergovaly ve *funkčně specifických úsecích*. V průběhu času se ale musely obě izoformy paralelně přizpůsobovat (v *druhově specifických úsecích*) interagujícím proteinům, které mohly být sekvenčně proměnlivější, čímž mohlo dojít k zamaskování dávné příbuznosti mezi funkčně specializovanými ortology.

Aby bylo rozlišeno mezi těmito dvěma hypotézami, byly sekvence podrobně analyzovány, zda neobsahují úseky specifické pro jednu či druhou izoformu a byly hledány úseky specifické pro druhy či vyšší taxonomické jednotky.

Evoluční tlak od případného interaktora by pravděpodobně působil primárně na aminokyselinovou sekvenci maturovaného proteinu. Signální peptidy pravděpodobně podléhají jiným tlakům. V nukleotidové sekvenci lze zase očekávat relativně velkou variabilitu díky synonymním mutacím. Vzájemné porovnání fylogenetických stromů vypočítaných z aminokyselinových a nukleotidových sekvencí maturovaného proteinu a z aminokyselinových i nukleotidových sekvencí signálního peptidu by tak mohlo naznačit mechanismus evoluce izoform PsbO.

4.4.2.2 Výsledky

Podrobným prohlédnutím zarovnaných aminokyselinových sekvencí maturovaného PsbO bylo nalezeno několik kandidátních pozic na funkční specializaci, kde byly rozdíly mezi izoformami (v rámci druhu) nalezeny u více čeledí (Obr. 4.15). Rozdíly jsou však v dané pozici vždy jen u několika druhů či skupin, ne u všech sekvencí. Navíc se tyto pozice

⁵ Dvě hypotézy evoluce izoform PsbO jsou v této kapitole uvedeny kvůli pochopení logiky práce. Zopakovány a podrobně rozebrány jsou v kapitole Diskuze.

nenacházejí v jedné oblasti, ale jsou rozptýlené po celé sekvenci. Za povšimnutí stojí srovnání s pozicemi, kde se u bramboru liší varianty PsbO1 (pozice označené hvězdičkou v Obr. 4.15). Místo rozdílu variant PsbO1a a PsbO1b (pozice 210) je pozicí častých rozdílů mezi izoformami v rámci druhu. Místo rozdílu variant PsbO1a a PsbO1c (pozice 49) je hned vedle pozice 47, kde jsou také časté rozdíly mezi izoformami. V tomto místě se nachází jeden z β -listů proteinu, kde jsou boční řetězce aminokyselin obrácené střídavě na jednu a na druhou stranu. Boční řetězce aminokyselin na pozicích 47 a 49 jsou tedy v prostoru přímo vedle sebe.

Fylogenetické stromy vypočítané z nukleotidové sekvence a z aminokyselinové sekvence maturovaného PsbO (bez signálního peptidu) čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) nejsou identické (Obr. 4.16). U stromu vytvořeného z nukleotidové sekvence se dá předpokládat, že díky možnosti synonymních mutací bude více odpovídat skutečné evoluci a nebude tolik zatížen případným tlakem druhově specifického interaktora. Tento strom (Obr. 4.16 A) se štěpí hned u báze na první a druhou izoformu. Strom vytvořený z aminokyselinových sekvencí (Obr. 4.16 B) se nejdříve rozvětňuje na podčeledi *Solanoideae* a *Nicotianoideae* a až pak na první a druhou izoformu. To odpovídá hypotéze, že se obě izoformy u každého druhu musely přizpůsobovat nějakému neznámému interagujícímu proteinu, který se vyvinul u každé podčeledi jiným směrem.

Ze zarovnaných aminokyselinových sekvencí signálních peptidů PsbO (Obr. 4.14) je vidět, že signální peptidy jsou mnohem méně konzervované než zbytek PsbO (Obr. 4.15). Jsou u nich mnohem častější i inzerce a delece. Dá se tedy očekávat, že na ně nepůsobí tak silný evoluční tlak interagujících proteinů a fylogenetický strom z nich vytvořený bude zřetelněji odrážet evoluční historii PsbO, stejně jako strom vypočítaný z nukleotidové sekvence maturovaného PsbO.

Stromy vytvořené ze signálních sekvencí lilkovitých (Obr. 4.17) neposkytují tak jasné rozdělení na jednu a druhou izoformu pravděpodobně kvůli příliš krátké sekvenci pro výpočet kvalitního fylogenetického stromu. Jejich topologie však odpovídají spíše topologii stromu vypočítaného z nukleotidových sekvencí maturovaného PsbO, který se na první a druhou izoformu štěpí už na bázi. Tento výsledek rovněž odpovídá hypotéze, že sekvenci maturovaného proteinu na rozdíl od sekvence signálního peptidu ovlivňuje neznámý interaktor.

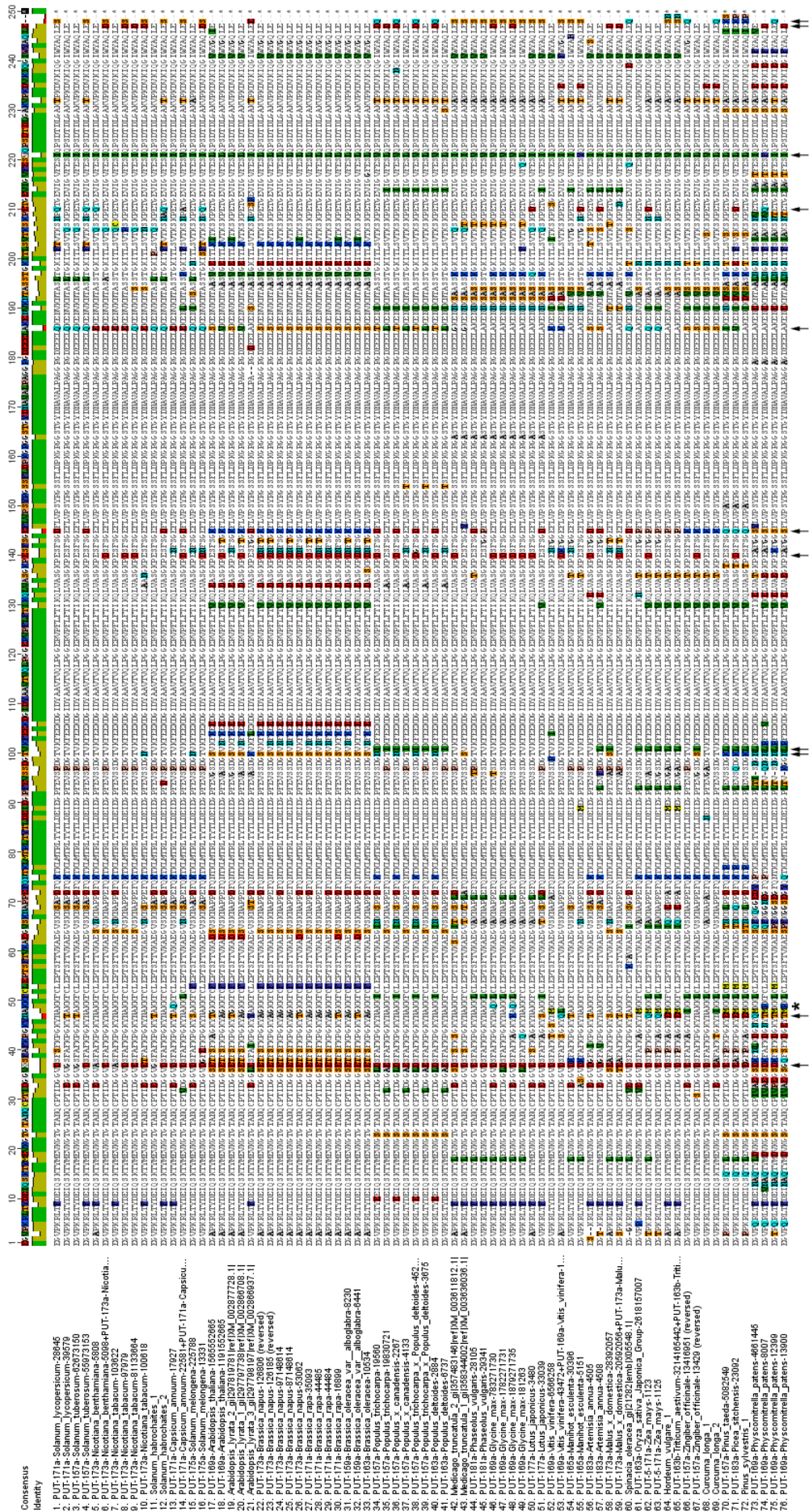
Obdobné výsledky jako u čeledi lilkovité byly získány i u čeledi bobovité (*Fabaceae*; Obr. 4.18). V případě fylogenetického stromu z nukleotidových sekvencí maturovaného PsbO (Obr. 4.18 A) tvoří dvě samostatné větve vždy dvě izoformy PsbO sóji (*Glycine max*) a jedna izoforma fazolu (*Phaseolus vulgaris*). Ve stromě vypočítaném z aminokyselinových sekvencí (Obr. 4.18 B) tvoří společnou větev všechny čtyři izoformy sóji, izoformy fazolu jsou zvlášť. Sekvence štirovníku (*Lotus japonicus*) a tolíce (*Medicago truncatula*) stojí ve fylogenetickém stromě nezávisle a podobný princip se na ně nevztahuje. Stejně jako u čeledi lilkovité mají

podobnou topologií jako strom z nukleotidových sekvencí maturovaného proteinu i stromy vypočítané ze signálních peptidů (nejdou ukázané).

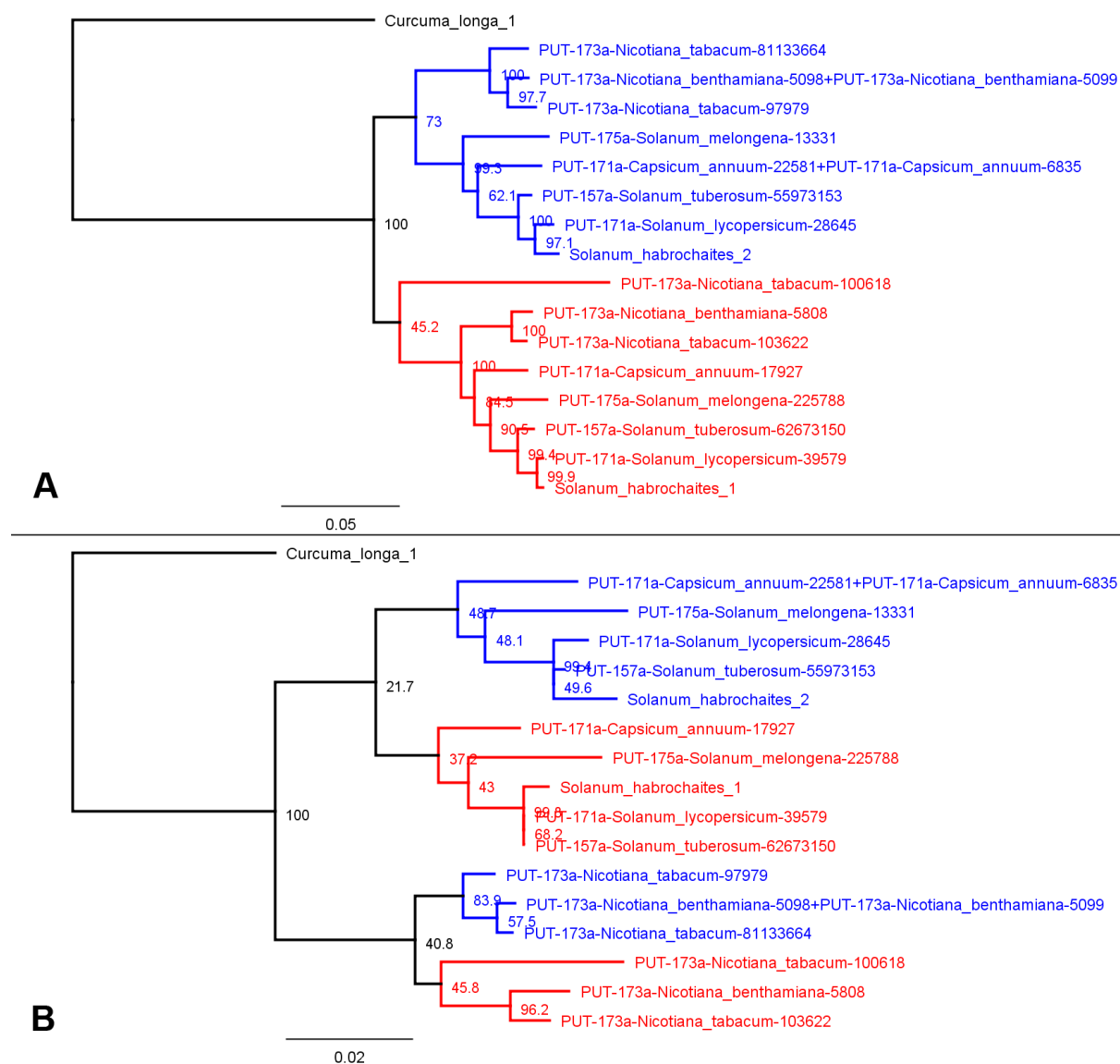
Čeď brukvovité (*Brassicaceae*) na rozdíl od lilkovitých a bobovitých poskytuje stále stejnou topologii fylogenetického stromu nezávisle na způsobu výpočtu. Fylogenetický strom (není ukázan) se vždy již na bázi dělí na dvě izoformy a až následně na dva zastoupené rody (*Brassica* a *Arabidopsis*).



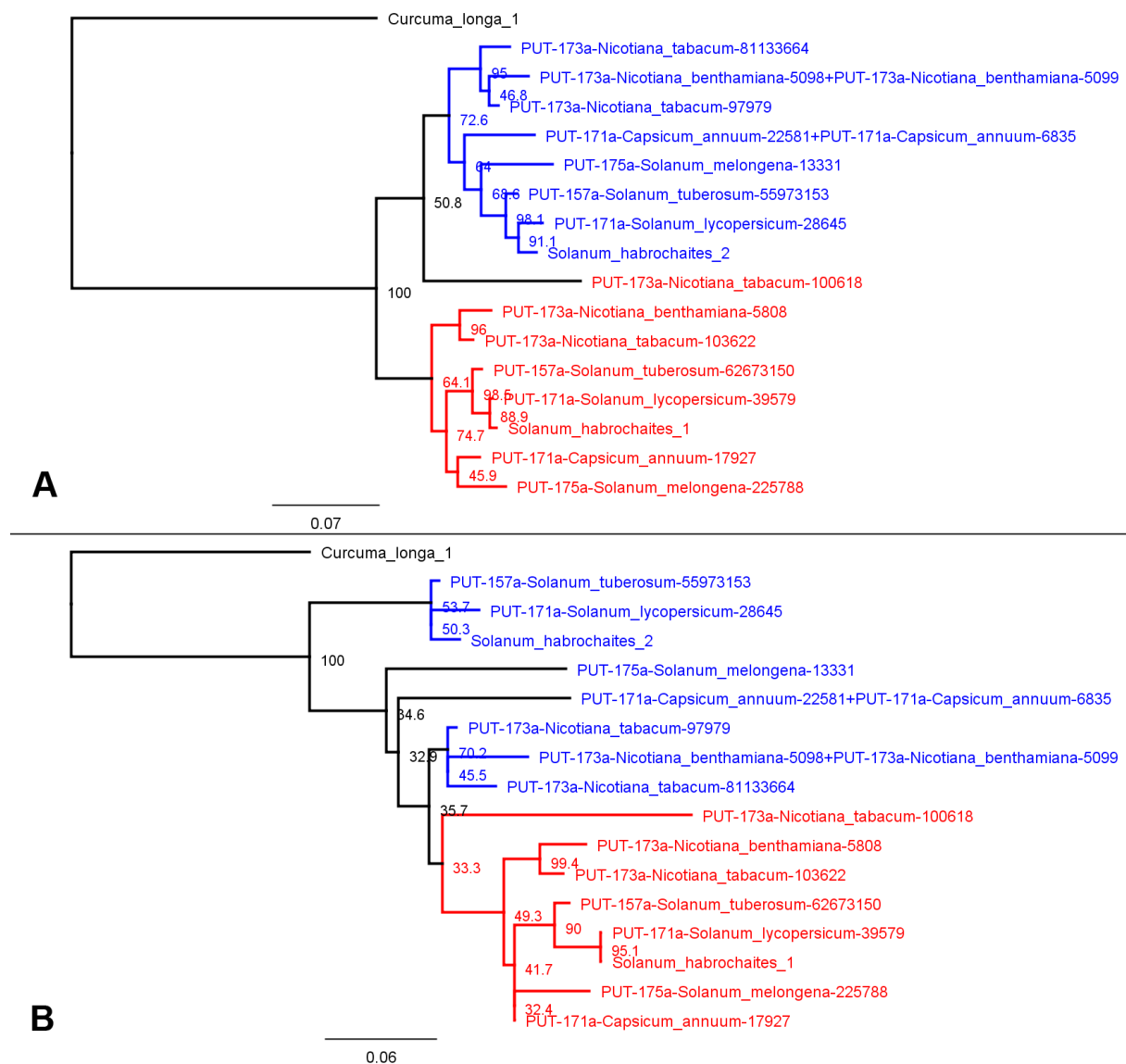
Obr. 4.14: Zarovnané sekvence signálních peptidů PsbO. Sekvence byly zarovnané v programu Geneious Pro 5.6.4 (Biomatters) algoritmem MAFFT. Aminokyseliny odlišné od konsenzuální sekvence jsou barevně zvýrazněné.



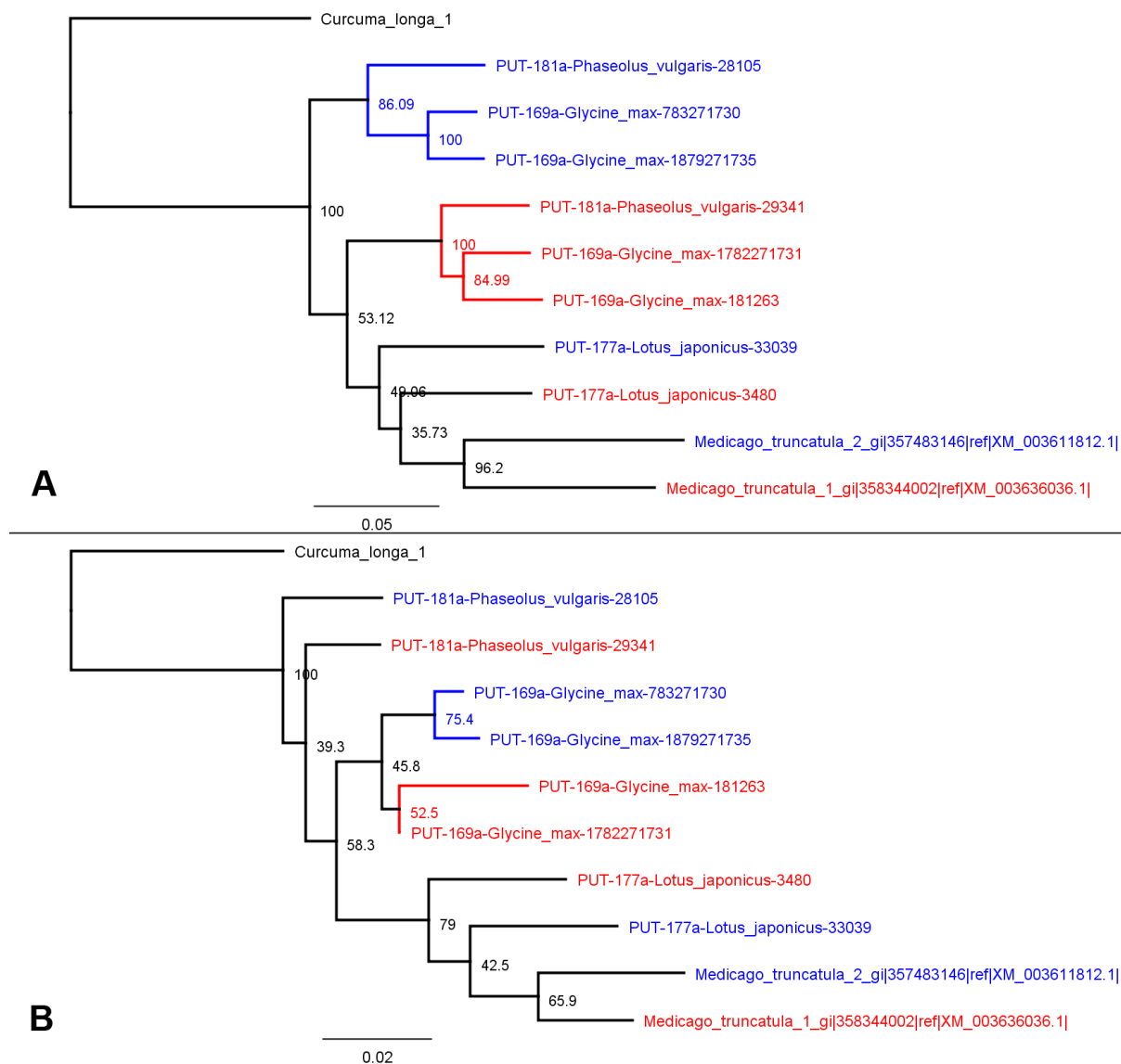
Obr. 4.15: Zarovnané sekvence maturovaného PsbO (bez signálního peptidu). Sekvence byly zarovnány v programu Geneious Pro 5.6.4 (Biomatters) algoritmem MAFFT. Aminokyseliny odlišné od konsenzuální sekvence jsou barevně zvýrazněné. Pozice s rozdíly mezi izoformami u více čeledí jsou označené šipkami. Pozice 210 a 49, ve kterých se liší varianty PsbO1b a PsbO1c od varianty PsbO1a u bramboru (Obr. 4.4) jsou označené hvězdičkou.



Obr. 4.16: Fylogenetické stromy vypočítané z (A) nukleotidové a (B) aminokyselinové sekvence maturovaného PsbO čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Modře jsou označeny izoformy odpovídající PsbO2 bramboru, červeně izoformy odpovídající PsbO1 bramboru. Podle nukleotidové sekvence (A) se strom u báze rozvětňuje na první a druhou izoformu, podle aminokyselinové sekvence (B) se nejdříve rozvětňuje na podčeledi *Solanoideae* a *Nicotianoideae* a až pak na první a druhou izoformu, což podporuje hypotézu o druhově proměnlivém interaktoru, který vyvíjí paralelní evoluční tlak na obě izoformy jednoho druhu. Stromy byly vytvořeny metodou Neighbor-Joining, jako outgroup byla použita sekvence PsbO kurkumy (*Curcuma_longa_1*). U jednotlivých větví jsou uvedeny bootstrapové hodnoty. Měřítka označují počet substitucí na jednu pozici.



Obr. 4.17: Fylogenetické stromy vypočítané z (A) nukleotidové a (B) aminokyselinové sekvence signálních peptidů PsbO čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Modře jsou označeny izoformy odpovídající PsbO2 bramboru, červeně izoformy odpovídající spíše PsbO1 bramboru. Podle nukleotidové sekvence (A) se strom u báze rozvětzuje na první a druhou izoformu (s výjimkou sekvence PUT-173a-Nicotiana_tabacum-100618). Strom vytvořený z aminokyselinových sekvencí (B) má topologii poněkud podivnou. To ale může být způsobeno špatným umístěním kořene způsobeným příliš krátkými sekvencemi (nejdelší signální peptid má délku 86 aminokyselin) a náhodnou podobností sekvence z kurkumy (*Curcuma_longa_1*) s jinými sekvencemi. Izoformy odpovídající PsbO1 bramboru (červené) tvoří ucelenou skupinu, pokud by byl vhodně posunut kořen stromu, i sekvence odpovídající PsbO2 bramboru (modré) budou tvořit ucelenou skupinu. Stromy byly vytvořeny metodou Neighbor-Joining, jako outgroup byla použita sekvence PsbO kurkumy (*Curcuma_longa_1*). U jednotlivých větví jsou uvedeny bootstrapové hodnoty. Měřítka označují počet substitucí na jednu pozici.



Obr. 4.18: Fylogenetické stromy vypočítané z (A) nukleotidové a (B) aminokyselinové sekvence maturovaného PsbO čeledi bobovité (*Fabaceae*). V obou stromech jsou stejné isoformy označeny stejnou barvou. Ve stromě vypočítaném z nukleotidových sekvencí (A) tvoří dvě samostatné větve vždy dvě isoformy PsbO sóji (*Glycine max*) a jedna isoforma fazolu (*Phaseolus vulgaris*). Ve stromě vypočítaném z aminokyselinových sekvencí (B) tvoří společnou větev všechny čtyři isoformy sóji, isoformy fazolu jsou zvlášť. Stromy byly vytvořeny metodou Neighbor-Joining, jako outgroup byla použita sekvence PsbO kurkumu (*Curcuma longa_1*). U jednotlivých větví jsou uvedeny bootstrapové hodnoty. Měřítka označují počet substitucí na jednu pozici.

4.4.3 Zobrazení rozdílů mezi isoformami a rozdílů mezi druhy na model terciární struktury PsbO

4.4.3.1 Popis a uspořádání experimentu

Jak je vidět ze zarovnaných sekvencí maturovaného PsbO (Obr. 4.15), v sekvencích PsbO se nevyskytují žádné jasně oddělené úseky specifické vždy pro jednu z izoform (u druhů rostlin, které mají více než jednu izoformu). Stejně tak nejsou v sekvencích jasně vymezené úseky společné pro druh či vyšší taxonomickou skupinu. Nepřítomnost takových

úseků v primární struktuře proteinu však neznámá, že se oblasti specifické pro izoformy a oblasti specifické pro druhy nemohou vyskytovat na terciární struktuře proteinu. Takové oblasti by, v případě nalezení, mohly naznačit, kde se nachází případný druhově specifický interaktor či u které části proteinu je výhodné, aby se funkčně lišila mezi izoformami.

Proto byl pomocí metody homologního modelování vytvořen podle známé struktury PsbO sinice model struktury PsbO2 bramboru. Aby nebylo zobrazování rozdílů mezi izoformami a mezi druhy zatíženo tím, že některé čeledi jsou zastoupené více druhy, bylo vybráno osm druhů rostlin z osmi různých čeledí (*Phaseolus vulgaris*, *Manihot esculenta*, *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, *Curcuma longa*, *Zea mays*). U všech těchto rostlin byly nalezeny dvě exprimované izoformy PsbO. Sekvence těchto izoform byly zarovnány a bylo určeno, na kterých pozicích převažují rozdíly mezi druhy (obě izoformy jednoho druhu jsou v daném místě stejné, ale liší se od konsenzuální sekvence), na kterých pozicích převažují rozdíly mezi izoformami (dvě izoformy jednoho druhu se od sebe v daném místě odlišují) a které pozice jsou zcela konzervované. Tyto informace o jednotlivých pozicích byly barevně znázorněny v modelu struktury PsbO2 bramboru.

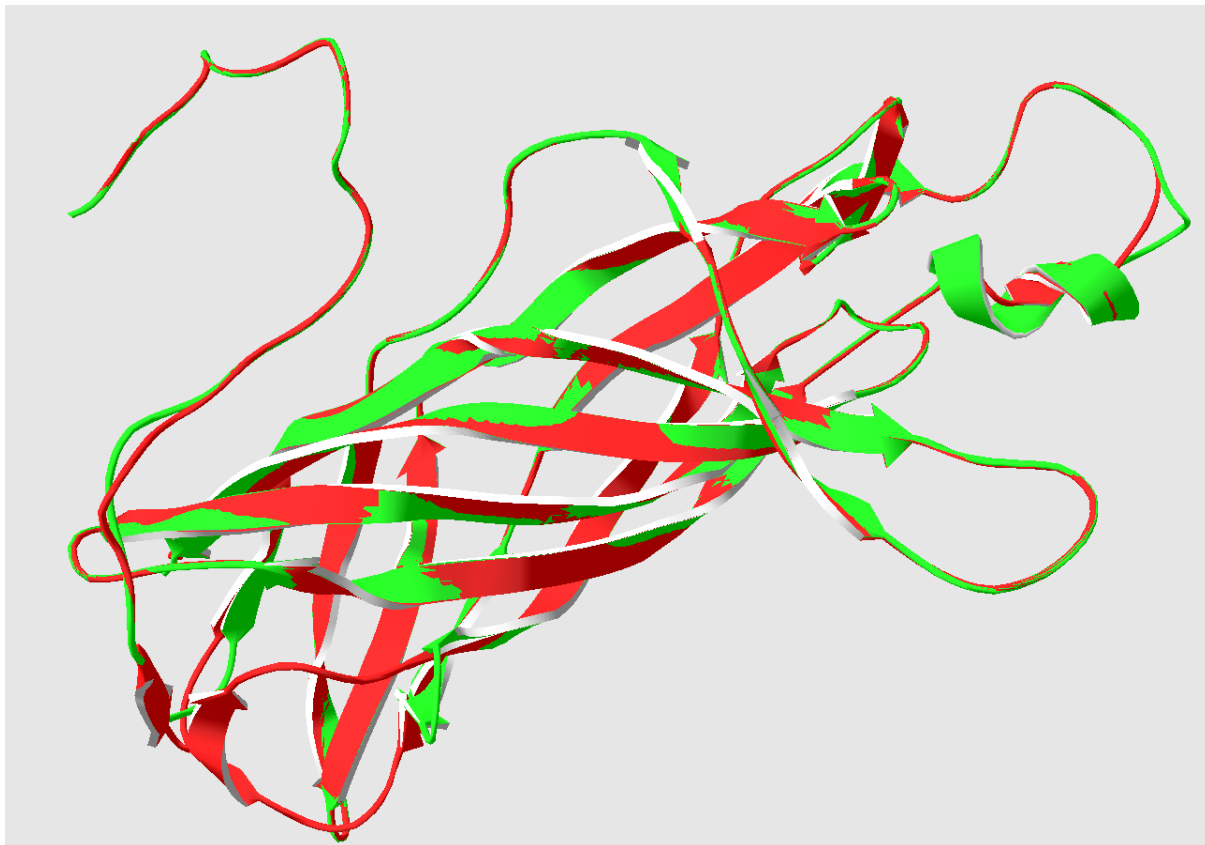
4.4.3.2 Výsledky

Model struktury PsbO2 bramboru (Obr. 4.19) byl vytvořen pomocí serveru Swiss-Model v. 8.05 (Arnold *et al.* 2006). Vzhledem k tomu, že PsbO sinice *Thermosynechococcus elongatus*, podle kterého byl model vytvořen, má kratší N-konec, v modelu PsbO2 bramboru chybí prvních 13 aminokyselin. Struktura modelu se od templátové struktury výrazně neliší. Jediná větší odlišnost je tzv. sinicová smyčka (β 4- β 5 smyčka), která je ve struktuře PsbO sinice výrazně delší (Obr. 4.19). Vzhledem k 47% identitě mezi aminokyselinovými sekvencemi templátu a modelovaného proteinu se dá očekávat, že model bude do velké míry odpovídat skutečné struktuře PsbO2 bramboru.

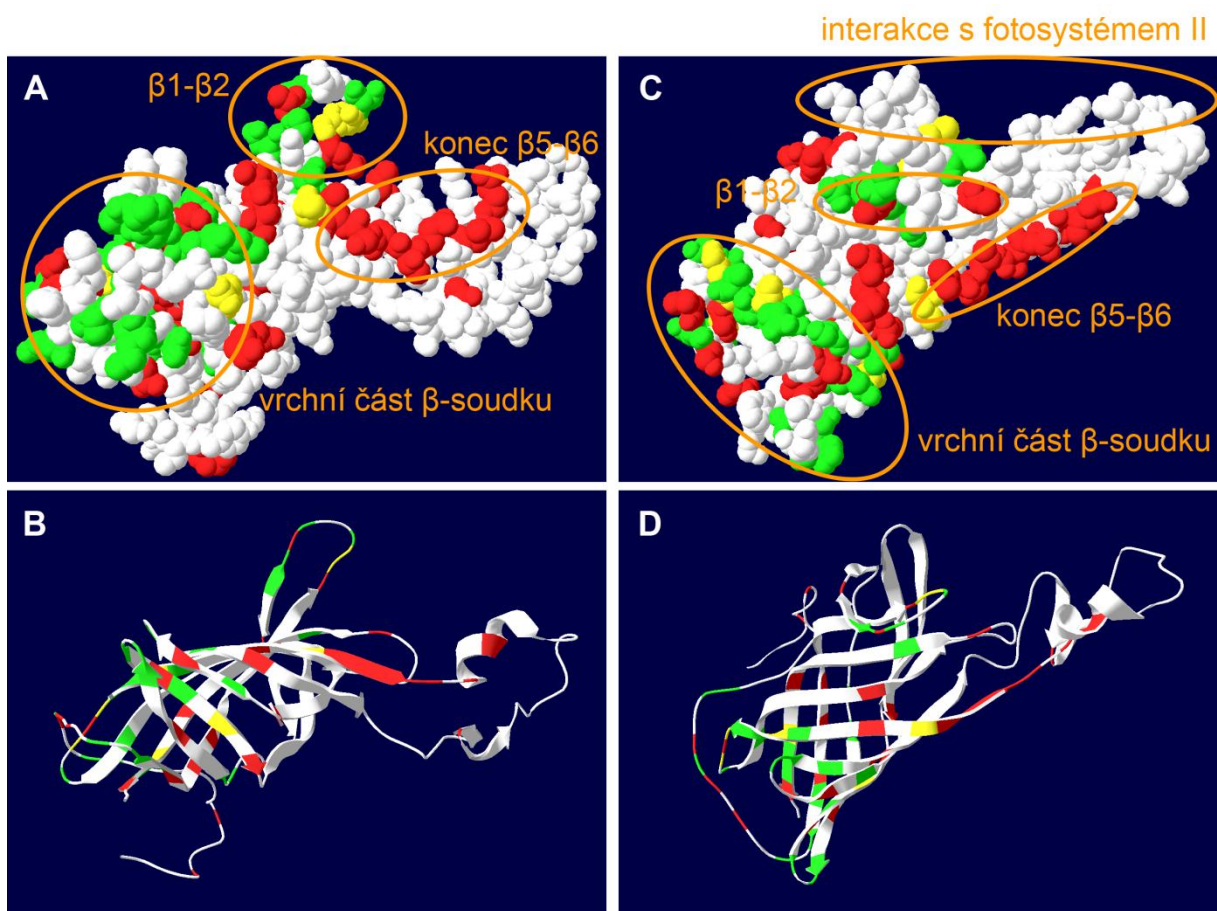
Ze zobrazení rozdílů mezi izoformami a rozdílů mezi druhy (čeleděmi) na model struktury PsbO2 bramboru (Obr. 4.20) je vidět, že ani na terciární struktuře nejsou zcela jasně vymezené oblasti, ve kterých se liší izoformy, a oblasti, ve kterých se liší druhy. Oblast, kterou PsbO nasedá na fotosystém II, je u sledovaných sekvencí téměř 100% konzervovaná. Rozdíly mezi izoformami jsou soustředěné především ve vrchní části β -soudku, která trčí do lumina tylakoidu, a v β 1- β 2 smyčce, kterou PsbO pravděpodobně interaguje s druhým fotosystémem v rámci dimeru fotosystému II (viz kap. 5.2.3).

Rozdíly mezi druhy se vyskytují rovněž ve vrchní části β -soudku, rozptýlené mezi pozicemi rozdílů mezi izoformami. Kromě toho však tvoří výraznou oblast na C-konci β 5- β 6 smyčky v oblasti PsbO směřující do lumina tylakoidu. Zde by se mohl nalézat případný druhově proměnlivý interaktor ovlivňující evoluci PsbO.

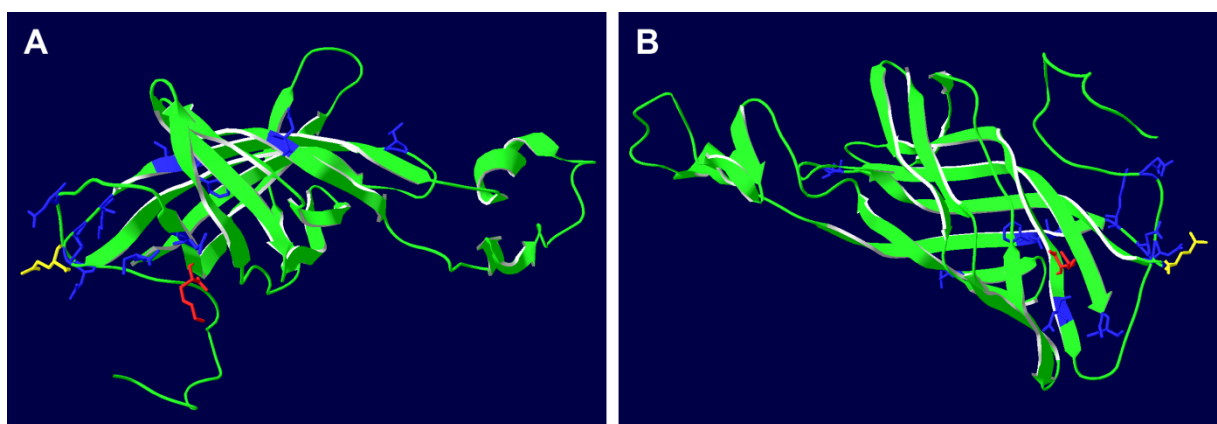
Na model struktury PsbO2 bramboru byly rovněž zobrazeny rozdíly mezi izoformami bramboru (Obr. 4.21). Rozdíly se vyskytují především v horní části β -soudku. Na β 1- β 2 smyčce není mezi izoformami překvapivě žádný rozdíl. Dvě aminokyseliny, kterými se liší jednotlivé varianty izoformy PsbO1, se obě vyskytují na pravé straně β -soudku při pohledu z lumina tylakoidu.



Obr. 4.19: Porovnání struktury PsbO sinice *Thermosynechococcus elongatus* (červeně) a podle ní vytvořeného modelu struktury PsbO2 bramboru (zeleně). PsbO sinice má kratší N-konec (vlevo nahoře), proto modelu PsbO2 bramboru chybí prvních 13 aminokyselin. Vlevo dole je možné povšimnout si tzv. sinicové smyčky, kterou mají sinice navíc oproti vyšším rostlinám. V ostatních částech se model velmi podobá templátové struktuře. Model byl vytvořen pomocí serveru Swiss-Model v. 8.05 (Arnold *et al.* 2006), náhled na strukturu v programu Swiss-PdbViewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997).



Obr. 4.20: Zobrazení rozdílů mezi izoformami a rozdílů mezi druhy na model struktury PsbO2 bramboru. Zelená – převážující rozdílů mezi izoformami, červená – převážující rozdílů mezi druhy, žlutá – stejné množství rozdílů mezi druhy a mezi izoformami, bílá – konzervované úseky. A, B – pohled z lumina tylakoidu kolmo na rovinu membrány. C, D – pohled z roviny tylakoidní membrány. Rozdíly byly určeny ze sekvencí 8 rostlin z 8 různých čeledí. Rozdíly mezi izoformami jsou především ve vrchní části β -soudku a v $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčce (označeno $\beta 1$ - $\beta 2$). Rozdíly mezi druhy jsou hlavně na konci $\beta 5$ - $\beta 6$ smyčky (označeno konec $\beta 5$ - $\beta 6$) a ve vrchní části β -soudku. Náhledy na strukturu byly vytvořeny v programu Swiss-PdbViewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997).



Obr. 4.21: Zobrazení rozdílů mezi izoformami bramboru na model struktury PsbO2 bramboru. Zelená – konzervované pozice, modrá – rozdíl mezi PsbO1a a PsbO2, žlutě – rozdíl mezi PsbO1a (glutamát), PsbO1b (aspartát) a PsbO2 (glutamin), červeně – rozdíl mezi PsbO1a (lysin) a PsbO1c (asparagin). A – pohled směrem z lumina tylakoidu, B – pohled z roviny tylakoidní membrány (část, kterou PsbO nasedá na fotosystém II, je nahoře). Náhledy na strukturu byly vytvořeny v programu Swiss-PdbViewer 4.0.4 (Guex & Peitsch 1997).

4.4.4 Aminokyselinové složení PsbO

Při práci se sekvencemi bylo mimo jiné zjištěno, že maturovaný PsbO neobsahuje ve své sekvenci téměř žádné histidiny. V 78 vyhledaných sekvencích mRNA je kódován v oblasti maturovaného proteinu pouze jeden histidin, v jedné izoformě PsbO manioku (PUT-165a-Manihot_esculenta-30396). V signálních peptidech se histidiny vyskytují (v signálních peptidech zmíněných 78 sekvencích se nachází 51 histidinů). V databázi UniProt (<http://www.uniprot.org>) byly vyhledány všechny sekvence anotované jako PsbO. Pouze sekvence dvou příbuzných sinic (*Thermosynechococcus elongatus* a *Synechococcus elongatus naegeli*) obsahovaly v maturovaném proteinu poblíž C-konce dva histidiny. Sekvence maturovaného PsbO žádných dalších sinic ani jiných organismů histidiny neobsahovaly.

4.4.5 Srovnání genomových sekvencí PsbO

4.4.5.1 Popis a uspořádání experimentu

Při vyhledávání sekvencí PsbO bylo zjištěno, že geny *psbO* mechu čepenky (*Physcomitrella patens*), rýže i huseníčku mají ve stejném místě intron. Sekvence intronu by teoreticky měly mutovat s daleko větší mírou náhodnosti než nukleotidová sekvence proteinu či sekvence signálního peptidu. Proto byly vyhledány dostupné genomové sekvence s cílem vytvořit fylogenetický strom z homologního intronu, aby byl dále prozkoumán způsob evoluce PsbO.

Dalším cílem bylo zjistit, zda některé genomové sekvence PsbO neobsahují další introny.

4.4.5.2 Výsledky

V databázích byly vyhledány geny *psbO* sedmi rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*), které odpovídaly nalezeným mRNA. Sekvence genů *psbO* bramboru byly získány sekvenováním (viz výše).

V genomu huseníčku byl kromě genů *psbO1* a *psbO2* (At5g66570 a At3g50820) odpovídajících exprimovaným mRNA nalezen ještě předpokládaný pseudogen *psbO3* (At4g37230). Tato sekvence *psbO* má mnoho rozsáhlých delecí a v databázích nebyly nalezeny žádné EST, které by jí odpovídaly. V úsecích sekvence, které jsou zachované, se tato sekvence velmi podobá třetí izoformě řeřišničníku, která je také možná pseudogenem (sekvence Arabidopsis_lyrata_3_gi|297798197|ref|XM_002866937.1|).

V genomu rajčete bylo kromě dvou exprimovaných izoform nalezeno 6 různých pravděpodobných pseudogenů *psbO* – nekompletních fragmentů genu *psbO*.

V získaných genech byly nalezeny introny na dvou různých místech. Intron 1 se nachází na konci nukleotidové sekvence signálního peptidu (12 bází před hranicí signálního peptidu – maturovaný protein). Tento intron se nachází ve všech získaných sekvencích a jeho délka se

pohybuje od 117 (rýže) do 1 116 nukleotidů (jedna z izoform révy). Délka je velmi rozdílná i v rámci druhu, například druhá izoforma révy má intron dlouhý pouze 215 nukleotidů. Rajče má v jedné izoformě intron dlouhý 995 bází, v druhé izoformě pouze 143 bází.

Intron 2 se nachází 282 bází za hranicí signální peptid–maturovaný protein. Nalezen byl pouze u rodu *Arabidopsis* (huseníček a řeřišničník), avšak u všech jeho izoform. Jeho délka se pohybuje od 68 do 98 nukleotidů.

Vzhledem k velkým rozdílům v délce intronu 1 a velice nízké podobnosti jeho sekvencí nebylo možné sekvence zarovnat a vypočítat z nich fylogenetický strom, který by poskytl důvěryhodné informace.

5 Diskuze

5.1 Identifikace proteinových spotů PsbO na gelu z 2D IEF-SDS PAGE

Jedním z cílů práce bylo zjistit, čím se liší jednotlivé proteinové spoty na dvourozměrné elektroforéze, které byly identifikovány jako PsbO. Na gelech z 2D IEF-SDS PAGE tylakoidních proteinů bramboru se PsbO vyskytuje v až 10 spotech o různých izoelektrických bodech.

Více spotů tvořených PsbO bylo nalezeno i na 2D gelech tylakoidního proteomu huseníčku a špenátu (Schubert *et al.* 2002). Genomem kódované izoformy PsbO huseníčku jsou právě dvě a mají trochu odlišné mobility na SDS-PAGE. Na 2D gelech tvoří každá z nich několik spotů o různých izoelektrických bodech (Schubert *et al.* 2002). Není nám známo, že by se někdo zabýval otázkou, čím se tyto spoty liší.

Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie se nám podařilo u většiny spotů PsbO bramboru určit, o kterou jde izoformu či variantu izoformy – u kulturního bramboru se vzhledem k tetraploidnímu genomu mohou geny pro každou PsbO izoformu vyskytovat v až čtyřech alelách (jimy kódované proteiny jsou v textu označovány jako varianty izoform). Vzhledem k tomu, že elektroforetické rozdělení proteinů nebylo dokonalé, většina spotů byla kontaminovaná izoformami či variantami izoform z vedlejších spotů. Porovnáváním intenzit signálů podobně velkých rozdílových peptidů v hmotnostních spektrech se nám ve většině případů podařilo určit, které izoformy je ve spotu nejvíce. Ionizace metodou MALDI sice není kvantitativní, ionizovatelnost námi sledovaných rozdílových peptidů se však zjevně výrazně nelišila.

Z 10 nalezených spotů je pravděpodobně pět tvořeno izoformou PsbO2. Ke třem spotům byly po jedné přiřazeny varianty izoformy 1 (PsbO1a, PsbO1b, PsbO1c). Jeden další spot je tvořen variantou PsbO1a nebo PsbO1c (nepodařilo se rozlišit, o kterou variantu jde). U posledního spotu se nepodařilo rozhodnout ani, zda jde o PsbO1 nebo PsbO2.

Přítomnost PsbO2 ve více spotech by se dala vysvětlit existencí více variant s drobnými rozdíly, stejně jako u PsbO1, nebo nějakou variabilní posttranslační modifikací. Žádnou z těchto hypotéz se však nepodařilo pomocí hmotnostní spektrometrie potvrdit. Nepřítomnost větších posttranslačních modifikací na PsbO špenátu prokázali Svensson *et al.* (2002), kteří ukázali, že hmotnost celého proteinu určená pomocí hmotnostní spektrometrie souhlasí s teoretickou hmotností určenou z aminokyselinové sekvence.

Případné drobné rozdíly mezi hmotnostními spektry by pravděpodobně mohly být vyhledány pomocí specializovaného programu detailně porovnávajícího spektra. Například

program SPECLUST umožňuje identifikaci specifických píků pomocí hierarchického klastrování hmotnostních spekter (Granlund *et al.* 2011).

Nejsilnější spoty, tvořené největším množstvím proteinů, byly určeny jako PsbO2 a tři varianty PsbO1, které byly identifikovány i na úrovni nukleových kyselin. Na některých 2D gelech připravených dříve Lukášem Fischerem byly pozorovány pouze tyto spoty (Fischer *et al.* 2008). Je zde proto také možnost, že ostatní spoty jsou artefakty metody izoelektrického fokusování. Výskyt stejného proteinu ve více spotech s různým izoelektrickým bodem na gelech z 2D IEF-SDS PAGE je poměrně častý jev (viz např. gely v Kieselbach *et al.* 2000 či Granlund *et al.* 2009). Jedním z možných vysvětlení je, že část proteinů není dostatečně denaturována (rozbalena) v rehydratačním roztoku a při izoelektrické fokusaci pak nejsou některé nabitě skupiny proteinu vystaveny roztoku, čímž mění zdánlivý izoelektrický bod proteinu (Wolfgang Schröder, osobní sdělení). Tuto hypotézu by podporovalo i zjištění z CD spektrometrie, že disulfidický můstek v izolovaném PsbO ze špenátu je velmi stabilní a krátkodobé ošetření redukčním činidlem nestačilo k jeho rozvolnění.

5.2 Evoluce PsbO

5.2.1 Počet izoform PsbO

Součástí práce bylo zjistit, jestli vedle huseníčku a bramboru mají i další rostliny více izoform PsbO. Ve veřejně dostupných databázích jsme vyhledali sekvence kódující PsbO. S překvapením jsme zjistili, že většina vyšších rostlin s dostatečným množstvím sekvencí v databázi exprimuje právě dvě izoformy *psbO*.

U všech dvouděložných rostlin, kterými jsme se zabývali, jsme našli minimálně 2 izoformy. Jedinou výjimkou je špenát, u kterého je známa pouze jedna izoforma. Není nám však známo, že by se někdo pokoušel najít druhou izoformu PsbO u špenátu. V databázích se nenacházejí téměř žádné sekvence EST špenátu, takže z databází není možné zjistit, jestli se ve špenátu nevyskytuje mRNA kódující další izoformu. PsbO tvoří na gelech z 2D IEF-SDS PAGE lumina tylakoidů špenátu více spotů, ale podle literatury byla pomocí hmotnostní spektrometrie nalezena pouze jedna izoforma (Schubert *et al.* 2002). Je však možné, že pokud je ve špenátu, stejně jako v huseníčku, druhé izoformy výrazně méně a je dostatečně podobná první izoformě, byly rozdílové píky v hmotnostních spektrech jednotlivých spotů přehlédnuty. Bylo by proto zajímavé tyto spoty analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie detailněji, popřípadě se pokusit druhou izoformu amplifikovat z cDNA s primery navrženými na konzervované úseky.

U jednoděložných rostlin je situace složitější. Dva zkoumaní zástupci čeledi zázvorníkovité (*Zingiberaceae*) sice exprimují po dvou izoformách PsbO, tři ze čtyř zástupců čeledi lipnicovité však exprimují pravděpodobně pouze jednu izoformu. Pouze u kukuřice byly nalezeny dvě izoformy PsbO, avšak hodně podobné, liší se pouze v 6 aminokyselinách.

U všech tří zástupců jednoděložných rostlin byla nalezena pouze jedna izoforma PsbO. Zástupce mechů, čepenka, exprimuje 4 izoformy PsbO. U vranečku byly nalezeny 2 exprimované izoformy, jedna z nich je však pravděpodobně slabě exprimovaným pseudogenem.

Podle uvedených informací by se dalo očekávat, že společný předek rostlin (minimálně krytosemenných) měl dvě izoformy, z nichž jedna u některých druhů sekundárně vymizela, u některých druhů naopak došlo celogenomovou duplikací k zvýšení počtu na 4. Tomu však nenásvědčuje fylogenetický strom vytvořený z vyhledaných sekvencí PsbO. Fylogenetický strom vytvořený ze sekvencí PsbO má neobvyklou topologii (Obr. 4.13). Na jednotlivé vzájemně paralogní izoformy se neštěpí u báze, jak by se dalo očekávat, ale spíše až na koncích jednotlivých větví, na úrovni čeledí či ještě nižších taxonomických jednotek.

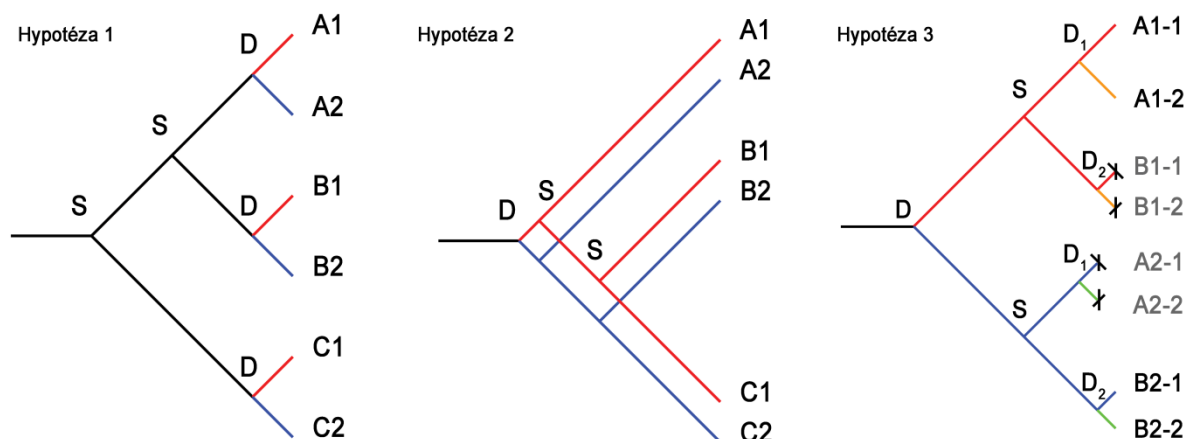
5.2.2 Evoluce izoforem PsbO

Topologie fylogenetického stromu nás vedla k formulování tří různých hypotéz o evoluci PsbO (Obr. 5.1):

Hypotéza 1 (nedávná duplikace): Duplikace PsbO proběhla v evoluci poměrně nedávno, a tedy nezávisle na sobě u předků mnoha skupin. Po duplikaci si dceřiné izoformy podržely *druhově specifické úseky* (typické pro jednotlivé skupiny rostlin) a divergovaly v úsecích ovlivňujících funkci proteinu (*funkčně specifické úseky*).

Hypotéza 2 (dávná duplikace): Duplikace PsbO proběhla v evoluci velmi dávno a izoformy divergovaly ve *funkčně specifických úsecích*. V průběhu času se ale musely obě izoformy paralelně přizpůsobovat (v *druhově specifických úsecích*) interagujícím proteinům, které mohly být sekvenčně proměnlivější, čímž mohlo dojít k zamaskování dávné příbuznosti mezi funkčně specializovanými ortology.

Hypotéza 3 (opakovaná duplikace a vymizení): V průběhu evoluce docházelo k opakované duplikaci PsbO, například v rámci celogenomových duplikací, a jednotlivé izoformy postupně divergovaly. Pro rostliny je výhodné exprimovat dvě pouze mírně odlišné izoformy, proto zůstaly zachovány vždy dvě nejpodobnější izoformy a ostatní z genomu vymizely.



Obr. 5.1: Ilustrace hypotéz evoluce izoforem *PsbO*. S – speciace, D – duplikace, písmeno (A, B, C) označuje druh, číslo označuje izoformu.

Hypotéze 1 nasvědčuje samotný fylogenetický strom, je to nejjednodušší vysvětlení. Zdá se být však silně nepravděpodobné, že by společný předek rostlin měl pouze jeden gen *psbO*, který by se relativně nedávno v evoluci duplikoval zcela nezávisle u mnoha skupin. Možnou příčinou by mohlo být, že přítomnost dvou izoforem začala být selekční výhodou až po nějaké události v historii Země, například změně složení atmosféry. Argumentem pro tuto hypotézu je skutečnost, že všechny izoformy rodu *Arabidopsis* (huseníčku a řeřišničníku) mají v genomové sekvenci na stejném místě specifický intron, který nebyl u jiných skupin s dostupnou genomovou sekvencí nalezen.

Hypotézu 2 částečně podporuje fakt, že se od sebe částečně liší fylogenetický strom vytvořený z aminokyselinové sekvence maturovaného proteinu, která je nejvíce ovlivněná případným evolučním tlakem interagujících proteinů, od fylogenetického stromu vytvořeného ze sekvencí méně závislých na případném evolučním tlaku interaktorů (nukleotidová sekvence maturovaného proteinu a nukleotidová i aminokyselinová sekvence signálního peptidu). U dvou čeledí jsme pozorovali, že strom vytvořený z nukleotidových sekvencí *PsbO* se na paralogy štěpil na úrovni vyšší taxonomické jednotky než strom vytvořený z aminokyselinových sekvencí (Obr. 4.16, Obr. 4.18). Tento efekt však nebyl příliš silný. Nejen aminokyselinové sekvence, ale i nukleotidové sekvence, které díky synonymním mutacím mohou mutovat relativně nezávisle, jsou si u vzájemně paralogních izoforem poměrně podobné.

Silná podpora pro tuto hypotézu nebyla získána ani zobrazením rozdílů mezi izoformami a mezi druhy na model struktury *PsbO*. Pokud by platila tato hypotéza, dalo by se očekávat, že na struktuře *PsbO* bude oblast (či více oblastí) důležitá pro rozdílné funkce jedné a druhé izoformy a oblast důležitá pro interakci s proteinem, který je výrazně divergovaný u jednotlivých druhů. Žádné jasně vymezené oblasti, kterým by se daly přisoudit takovéto funkce, na struktuře však nalezeny nebyly (Obr. 4.20). Rozdíly mezi izoformami a rozdíly

mezi druhy jsou na struktuře spíše rozptýleny mezi sebou. Jediná jasněji vymezená oblast je konec $\beta 5$ - $\beta 6$ smyčky, který je v části PsbO směřující do lumina, a kde jsou více koncentrované rozdíly mezi druhy. Mohlo by to tedy být místo interakce s druhově specifickým proteinem. Rozdíly mezi sekvencemi však v tomto místě nejsou tak významné, aby pomocí nich mohla být vysvětlena celá evoluce PsbO. Hypotézu 2 navíc také vyvrací přítomnost unikátního intronu u obou paralogů v rodu *Arabidopsis*.

Hypotéza 3 je částečně podobná hypotéze 1. Předpokládá, že k duplikaci PsbO došlo vícekrát nezávisle. Počítá však s tím, že společný předek mohl mít také více izoform. Navíc vysvětluje mechanismus vícenásobných duplikací. Předpokládá se, že k celogenomovým duplikacím docházelo poměrně často v evoluci rostlin, například genom huseníčku obsahuje stopy 3–4 celogenomových duplikací (Blanc & Wolfe 2004; Soltis *et al.* 2009). Aby nedocházelo k neustálému nárůstu velikosti genomu, rostliny se po duplikaci postupně opět částí genomu zbavovaly. Z topologie fylogenetického stromu se zdá, že po poslední celogenomové duplikaci zůstala prakticky u všech krytosemenných rostlin zachována právě jedna dvojice paralogů *psbO* pocházející z této poslední duplikace. Přítomnost dvou izoform tedy buďto začala být selekční výhodou až po poslední duplikaci (hypotéza 1) a nebo případné starší paralogy, pokud byly v genomu v okamžiku poslední genomové duplikace přítomny, bylo výhodné ztratit a nahradit je novými, podobnějšími.

Nahrazení starých paralogů nově vzniklými kromě samotného fylogenetického stromu a unikátního intronu *Arabidopsis* podporuje také častá přítomnost pseudogenů *psbO* v genomech rostlin – předpokládaných pozůstatků po vymizelých izoformách. V genomu huseníčku byl nalezen jeden pseudogen. Podobný gen byl nalezen také v genomu řeřišničníku, tam však není jisté, zda se jedná o pseudogen, nebo jestli je tento gen exprimován. V genomových sekvencích rajčete bylo nalezeno pseudogenů 6. Dále tuto hypotézu podporují výsledky analýz kolinearity okolí jednotlivých genů *psbO* u huseníčku. Okolí genů *psbO1* a *psbO2* huseníčku vykazuje vysokou míru kolinearity. Okolí pseudogenu *psbO3* je s těmito úseky také kolineární, ovšem výrazně méně (Duchoslav a Vosolsobě, nepublikované výsledky).

Mohlo by se zdát, že hypotéza 3 nasvědčuje také pozice *psbO3* řeřišničníku ve fylogenetickém stromě, kde páruje s velkou skupinou jiných sekvencí nenáležejících čeledi brukvovité (Obr. 4.13, sekvence *Arabidopsis_lyrata_3_gi|297798197|ref|XM_002866937.1|*). To je však zjevný artefakt, neboť genomová sekvence tohoto genu obsahuje intron specifický pro *Arabidopsis*. Této hypotéze však může nasvědčovat jedna ze sekvencí *psbO* tabáku (PUT-173a-Nicotiana_tabacum-100618), která se odděluje už na bázi čeledi lilkovité (Obr. 4.13) a mohla by být pozůstatkem staré větve izoform, které jinak u lilkovitých vymizely.

5.2.3 Rozdíly mezi izoformami

Nejdůležitější nezodpovězenou otázkou evoluce PsbO vyšších rostlin zůstává, proč je pro většinu rostlin výhodné mít dvě izoformy, které se ve většině případů liší v méně než 20 aminokyselinách.

Jednou z možností je, že rozdíly mezi izoformami jsou čistě náhodné, izoformy mutují tam, kde to nemění funkci proteinu. Z rozdílů mezi izoformami a mezi proteiny zobrazenými na model struktury (Obr. 4.20) je vidět, že část PsbO interagující s PSII je téměř 100% konzervovaná. K podobnému poznatku dospěli i De Las Rivas & Barber (2004), kteří porovnávali sekvence PsbO z celého spektra oxyfototrofních organismů, od sinic přes zelené řasy k vyšším rostlinám. Náhodnosti mutací nahrává, že rozdíly mezi izoformami v rámci druhu a mezi druhy jsou často na stejných místech (Obr. 4.15) a jsou přibližně rovnoměrně rozptýlené ve vrchní části β -soudku, která trčí do lumina tylakoidu (Obr. 4.20). Navíc jde často o záměny za podobné aminokyseliny (například isoleucin a valin, glutamát a aspartát), které příliš nemění vlastnosti proteinu. Odporuje tomu však funkční rozlišení izoform PsbO huseníčku široce popsané v literatuře (Murakami *et al.* 2005; Lundin *et al.* 2007a, 2008; Bricker & Frankel 2008; Allahverdiyeva *et al.* 2009; viz kap. 2.2.8). Stejně tak mutantní brambor s chybějící variantou jedné z izoform PsbO má jasně pozměněný fenotyp (Fischer *et al.* 2008) včetně změn ve fotosyntetickém aparátu (Holá a Fischer, nepublikované výsledky). Jelikož ale nemohla být provedena komplementace mutace, není jisté, že chybějící izoforma (PsbO1a) je skutečnou příčinou fenotypových změn.

Pokud nejsou rozdíly mezi izoformami PsbO náhodné a jsou mezi nimi tedy i funkční rozdíly, je otázka, zda jsou rozdíly ve funkci stejné napříč taxonomickými skupinami. Jinými slovy, má-li u huseníčku PsbO2 funkci regulátoru výměny poškozeného proteinu D1, je tomu tak například i u bramboru? Porovnání sekvencí PsbO tomu spíše nenasvědčuje. Pokud vycházíme z předpokladu, že stejné funkční přizpůsobení je realizováno změnami na podobných pozicích proteinu, měly by být rozdíly mezi jednou a druhou izoformou rozpoznatelné v aminokyselinové sekvenci PsbO, popřípadě na struktuře PsbO.

V aminokyselinové sekvenci však nebyly nalezeny žádné pozice, které by jednoznačně určovaly, zda se jedná o izoformu 1 či o izoformu 2. Pouze na několika málo pozicích byly nalezeny rozdíly v izoformách u více taxonomických skupin. Jedna z nejzajímavějších pozic je C-konec proteinu, který je často u jedné izoformy delší (Obr. 4.15). V čeledi lilkovité má vždy jedna izoforma na C-konci navíc serin, stejně tak je tomu u révy vinné. Topoly (rod *Populus*) mají vždy jednu izoformu delší o glutamin, stejně jako kurkuma a zázvor z čeledi zázvorníkovité. O glutamin je prodloužená i jedna ze čtyř izoform mechu čepenky. Ostatní skupiny mají však izoformy PsbO na C-konci stejně dlouhé, například všechny sekvence PsbO čeledi bobovité mají C-konec prodloužený o serin, stejně jako polovina izoform lilkovitých. Vzhledem k experimentálnímu zjištění, že zkrácení C-konce PsbO huseníčku o 2

aminokyseliny má za následek jeho neschopnost vazby na PSII (Betts *et al.* 1998), je možné, že zrovna drobné změny na C-konci PsbO mohou mít důležitou funkci, ač se C-konec nachází v horní části β -soudku, která je vzdálená od membránových podjednotek PSII.

Rozdíly mezi izoformami se na modelu struktury PsbO nacházejí především v horní části β -soudku a na $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčce. Mohla by zde být souvislost s funkčními rozdíly popsány u izoform PsbO huseníčku. PsbO2 huseníčku má několikrát vyšší GTPázovou aktivitu než PsbO1 (Lundin *et al.* 2008). Bylo předpokládáno, že vazebné místo pro GTP se nachází právě v horní části β -soudku a hydrolýza GTP na GDP by mohla měnit konformaci $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčky (Lundin *et al.* 2007b). Předpokládá se, že $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčka interaguje s druhým monomerním PSII v rámci dimeru, a tím dimer stabilizuje. Role PsbO2 huseníčku pravděpodobně souvisí s cyklem výměny poškozeného proteinu D1 (Lundin *et al.* 2007a, 2008; Allahverdiyeva *et al.* 2009), jehož součástí je monomerizace PSII před opuštěním granální tylakoidní membrány a přesunem do stromatální tylakoidní membrány (Aro *et al.* 2005). Je tedy možné, že i u ostatních rostlin souvisí rozdíly mezi izoformami s GTPázovou aktivitou a vlivem na monomerizaci PSII – rozdíly mezi izoformami v horní části β -soudku mohou souviset s vazbou GTP a jeho hydrolýzou, rozdíly na $\beta 1$ - $\beta 2$ smyčce mohou souviset s vlivem PsbO na dimerizaci/monomerizaci PSII. Bylo by zajímavé tyto domněnky ověřit experimentálně, k čemuž by pravděpodobně byly nejvhodnější dva přístupy: (1) v *in vitro* podmínkách porovnat schopnost izoform PsbO exprimovaných v *E. coli* zajišťovat produkci kyslíku fotosystémem II a změřit jejich GTPázovou aktivitu, (2) přímo v rostlinách umlčet zvlášť jednu a druhou izoformu pomocí RNA interference a sledovat fenotypové projevy, jestli odpovídají mutantům *psbO1* a *psbO2* huseníčku. Vhodnou modelovou rostlinou by mohl být brambor.

Otázka zachování funkčních rozdílů mezi izoformami souvisí i s hypotézami o způsobu evoluce PsbO. Pokud by platila hypotéza 1 či 3 (relativně nedávná nezávislá duplikace), znamenalo by to, že funkční rozdíly mezi izoformami nejsou buď žádné, nebo mohou být teoreticky rozdílné u každé taxonomické jednotky. Hypotéza 2 (dávná duplikace) naopak počítá se zachováním jasných funkcí jednotlivých izoform v průběhu celé evoluce.

5.3 Dimerizace PsbO a jeho funkce ve skládání gran

PsbO exprimovaný v *E. coli* tvoří podle našich zjištění dimery – ty se objevily v elučních křivkách gelové filtrace a potvrzeny byly i pomocí hmotnostní spektrometrie. Je zde i možnost, že tvorba dimerů exprimovaného špenátového PsbO S95C byla způsobena vytvořením mezimolekulových S-S můstků mezi nadbytečnými cysteiny vloženými mutací serinu 95 za cystein. Dimerizace PsbO však již byla pozorována vícekrát i na PsbO s normálním počtem cysteinů (Enami *et al.* 1998; Anati & Adir 2000). V těchto experimentech byla tvorba dimerů spojována se zvýšenou koncentrací Ca^{2+} (Anati & Adir 2000). Při našem experimentu v pufrech vápenaté kationty nebyly, přítomno mohlo být pouze

malé množství vázané na PsbO v průběhu izolace. Bylo by zajímavé ověřit, jestli nízká koncentraci redukčního činidla, zabraňující vytvoření mezimolekulární disulfidických můstků, nezabrání tvorbě dimerů. Je však třeba uvážit, že případná redukce přirozeného vnitromolekulového S-S můstku má velký vliv na stabilitu struktury proteinu (Tanaka *et al.* 1989; Nikitina *et al.* 2008) a může mít tedy i negativní vliv na případnou dimerizaci PsbO. Kromě toho by mohlo být ověřeno, jestli jsou dimery tvořeny, i pokud by byla do pufrů přidána EGTA⁶, a jestli je tedy dimerizace závislá na Ca²⁺.

Albertsson (1982) zjistil, že lumenální strany tylakoidních membrán v granech spolu interagují. Obsahují proteiny, které jsou schopny je držet u sebe. Možnost účasti vnějších proteinů PSII na této interakci (štosování tylakoidních membrán do gran) již byla navržena vícekrát (De Las Rivas *et al.* 2007; Suorsa & Aro 2007). Obvykle jsou v této souvislosti zmiňovány proteiny PsbQ či PsbP (Chow *et al.* 2005; De Las Rivas *et al.* 2007; Bricker & Frankel 2011; viz kap. 2.2.7.7). Je zde ale také možnost, že se na interakci mezi membránami podílí i protein PsbO.

Převažuje názor, že u vyšších rostlin jsou k plné funkčnosti PSII třeba 2 moly PsbO na mol PSII (Popelkova *et al.* 2008; Bricker *et al.* 2012; viz kap. 2.2.6). Důkazy pro tuto hypotézu byly získávány v experimentech prováděných *in vitro* na izolovaných tylakoidních membránách, které tvoří grana. Jednou z možností vazby druhé kopie PsbO na PSII je tvorba homodimeru s první vázanou kopií (Bricker *et al.* 2012). Je tedy možné, že v *in vivo* podmínkách v granech je dimer tvořen dvěma PsbO, z nichž každý je vázán na PSII v opačné membráně, a zprostředkovává tak štosování membrán.

Naměřené šířky lumenálních částí gran jsou poměrně různorodé, liší se však především v chloroplastech adaptovaných na světlo (užší lumenální mezera) a v chloroplastech adaptovaných na tmu (širší lumenální mezera; Dekker & Boekema 2005). Podle Kouřil *et al.* (2012) jsou lumenální výběžky PSII moc objemné, aby v situaci s užší lumenální mezerou mohly být dva PSII přímo proti sobě. Předpokládá se však, že výstupky pozorované na PSII elektronovou mikroskopií mohou zahrnovat již dvě kopie PsbO (Boekema *et al.* 2000). Těsná interakce mezi PSII z protějších membrán, zprostředkovaná mimo jiné PsbO, by tedy pravděpodobně mohla nastat i v případě adaptace na světlo a užší šířky lumina. Tato těsnější interakce by navíc mohla souviset s potřebou zvýšené funkce PSII za světla, která by mohla být zajištěna tvorbou dimeru PsbO. V případě širší lumenální mezery za tmy je možné, že by byla interakce mezi PsbO z protilehlých fotosystémů přerušena (např. změnou konformace v důsledku změny pH – viz níže) – v takovém případě by volnější interakce mohla být zajištěna jinými proteiny, například PsbP či PsbQ. Dimer PsbO na PSII by v takovém případě

⁶ EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid, kyselina ethylenglykoltetraoctová) je chelatační činidlo účinně vyvazující vápenaté kationty.

mohl být utvořen s volným PsbO z roztoku, kterých je v tylakoidech dostatečné množství (Ettinger & Theg 1991; Hashimoto *et al.* 1996).

Argumentem proti hypotéze, že PsbO tvoří dimer s PsbO z protilehlého PSII, je fakt, že v modelu získaném kryoelektronovou tomografií si pozice PSII v membránách interagujících přes lumen neodpovídaly (Daum *et al.* 2010). Další argumentem je, že šířka luminální mezery je různorodá (Dekker & Boekema 2005). Dalo by se očekávat, že v případě specifické interakce mezi fotosystémy II by šířka lumen byla konstantní. Pokud by fotosystémy interagovaly různým způsobem za světla a tmy, daly by se očekávat dvě různé hodnoty šířky lumina v granech, ne celé spektrum. Je však otázka, do jaké míry rozměry lumina na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie odpovídají skutečnosti a do jaké míry jde o artefakt fixace (Dekker & Boekema 2005).

Zajímavé by bylo zjistit, jestli PsbO sinic a řas, které nevytvářejí grana, je také schopný tvorby dimerů.

U mutantní linie bramboru D69, které chybí izoforma PsbO1a (Fischer *et al.* 2008), byly nalezeny luminální mezery v granech mírně rozšířené oproti nemutovaným rostlinám bramboru (Kutík a Fischer, nepublikované výsledky). Zbývající dvě varianty izoformy 1 v bramboru (PsbO1b a PsbO1c), které se liší každá pouze v jedné aminokyselině od chybějící varianty PsbO1a, nejsou možná zcela schopny zastoupit variantu PsbO1a. Odlišnosti v PsbO1b a PsbO1c jsou v aminokyselinách, které mohou být podstatné pro interakci (PsbO1b: místo glutamátu aspartát, PsbO1c: místo lysinu asparagin) a nacházejí se obě v horní části β -soudku, kde se dá předpokládat interakce s protilehlým PsbO (Obr. 4.20). Jednotlivé izoformy a jejich varianty by tedy mohly mít funkci i v regulaci interakce luminálních stran membrán, a tedy i v regulaci štosování tylakoidních membrán do gran.

5.4 Vliv pH na strukturu PsbO

Shutova *et al.* (2005) předpověděli, že pH může mít vliv na strukturu PsbO. Mírně odlišná struktura při pH typickém pro lumen tylakoidů na světle (pH asi 5,7) a ve tmě (pH asi 7,2) by mohla upravovat funkci PsbO potřebnou za těchto různých podmínek. Fluorescenční sonda ANS, vázající se na hydrofobní aminokyseliny, se na PsbO váže při pH 5,7 ve větším množství než při pH 7,2. Z toho lze vyvodit, že hydrofobní jádro je při nižším pH přístupnější (Shutova *et al.* 2005).

My jsme sledovali odlišnosti v CD spektru při pH 5,7 a 7,2. Spektra jsou mírně odlišná a dá se z nich vyvodit, že při pH 5,7 má protein o něco více sekundární struktury než při pH 7,2 (Obr. 4.12). V literatuře zatím nebylo popsáno porovnání dvou CD spekter ve fyziologických hodnotách pH. Shutova *et al.* (1997) porovnávali CD-spektra PsbO při pH 2,8, 3,8 a 6,8. Při pH 2,8 měl PsbO spektrum denaturovaného proteinu. Spektra při pH 3,8 a 6,8 byla podobná a odpovídala spektru sbaleného proteinu. Weng *et al.* (2004) porovnávali CD spektra PsbO při

pH 2, 2,5, 4, 6 a 12. Sbalenému proteinu odpovídala pouze CD spektra při pH 4 a 6, která se téměř nelišila.

Abychom ověřili, že námi exprimovaný PsbO má vytvořený disulfidický můstek, měli jsme v plánu porovnat CD spektra nativního proteinu a proteinu s redukovanými cysteiny. Po přidání 4mM β -merkapt ethanolu se však CD spektra nijak znatelně nezměnila (Obr. 4.12). Porovnáním s CD spektry, která publikovali Tanaka *et al.* (1989), jsme zjistili, že všechna námi naměřená CD spektra odpovídají sbalenému proteinu s vytvořeným disulfidickým můstkem. Tanaka *et al.* (1989) změřili CD spektra PsbO v nativním stavu, PsbO redukovaného a PsbO denaturovaného pomocí guanidinium chloridu. CD spektrum redukovaného proteinu bylo velmi podobné spektru denaturovaného proteinu a značně se lišilo od sbaleného proteinu v nativním stavu. Obdobné CD spektrum jako denaturovaný a redukovaný protein měl protein PsbO C28A, C51A, který nemůže vytvořit disulfidický můstek (Wyman & Yocum 2005). Tanaka *et al.* (1989) měřili i kinetiku redukce S-S můstku PsbO. Po přidání 100mM DTT byl třeba čas v řádu desítek minut, aby byla zredukována většina PsbO. Představa, že 4mM β -merkapt ethanol zredukuje PsbO během několika minut, byla tedy mylná.

6 Závěry

6.1 Identifikace proteinových spotů PsbO bramboru na gelu z 2D IEF-SDS PAGE a izolace příslušných genů

U většiny z 10 spotů tvořených PsbO po rozdělení na dvourozměrné elektroforéze bylo pomocí hmotnostní spektrometrie určeno, o kterou izoformu či variantu izoformy se jedná. Nebyly nalezeny žádné posttranslační modifikace ani jiné rozdíly mezi spoty tvořenými stejnou variantou izoformy. Je možné, že méně výrazné spoty jsou artefakty metody. Byly izolovány a sekvenovány genomové a cDNA verze genů kódujících PsbO v bramboru.

6.2 Exprese psbO v *E. coli* a následná purifikace a analýzy rekombinantního proteinu

Pro PsbO ze špenátu byl optimalizován protokol pro rekombinantní expresi v *E. coli* a následnou purifikaci. Podle změřeného CD (circular dichroism) spektra má purifikovaný PsbO vytvořený disulfidický můstek a je správně sbalený. CD spektra PsbO při pH 5,7 a pH 7,2 naznačují změny konformace proteinu v závislosti na pH. Podle výsledků gelové filtrace a hmotnostní spektrometrie tvoří PsbO v roztoku dimery a větší agregáty. .

V souvislosti s tvorbou dimerů PsbO v roztoku byla navržena funkce PsbO ve skládání gran. S funkcí proteinu může rovněž souviset mírně rozdílná konformace proteinu při hodnotách pH typických pro lumen tylakoidu za světla či tmy. .

6.3 Bioinformatické analýzy

6.3.1 Počet izoform PsbO

Je pravděpodobné, že všechny (nebo téměř všechny) dvouděložné rostliny exprimují nejméně dvě mírně odlišné izoformy *psbO*. Nejčastější je exprese právě dvou izoform. Počet zkoumaných zástupců jednoděložných rostlin byl daleko menší, zdá se však, že některé exprimují pouze jednu izoformu *psbO* (většina zástupců čeledi *Poaceae*), některé dvě izoformy. Tři zkoumaní zástupci nahosemenných rostlin exprimují po jedné izoformě PsbO.

6.3.2 Evoluce a funkce izoform PsbO

Fylogenetický strom vytvořený ze sekvencí *psbO* má podivnou topologii, na vzájemně paralogní izoformy se štěpí až na koncích větví. Se současnými informacemi se zdá být nejpravděpodobnější hypotéza, že duplikace *psbO* probíhala v rámci celogenomových duplikací, po nichž byla zachována prakticky vždy pouze jedna dvojice velmi podobných izoform.

V sekvencích ani na modelu struktury PsbO nebyly nalezeny žádné oblasti jasně definující jeden či druhý typ izoformy. Rozdíly mezi izoformami se však na struktuře nejčastěji vyskytují v místech, která by mohla souviset s funkčními rozdíly mezi izoformami popsanými u huseníčku.

7 Použitá literatura

- Ädelroth P., Lindberg K., Andreasson L.-E. (1995) Studies of Ca²⁺ Binding in Spinach Photosystem II Using ⁴⁵Ca²⁺. *Biochemistry* **34**: 9021–9027.
- Albertsson P.-Å. (1982) Interaction between the lumenal sides of the thylakoid membrane. *FEBS Letters* **149**: 186–190.
- Allahverdiyeva Y., Mamedov F., Holmström M., Nurmi M., Lundin B., Styring S., Spetea C., Aro E.-M. (2009) Comparison of the electron transport properties of the *psbo1* and *psbo2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**: 1230–1237.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402.
- Altschul S.F., Wootton J.C., Gertz E.M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A.A., Yu Y.-K. (2005) Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal* **272**: 5101–5109.
- Anati R., Adir N. (2000) Crystallization of dimers of the manganese-stabilizing protein of Photosystem II. *Photosynthesis Research* **64**: 167–177.
- Andaluz S., López-Millán A.-F., De las Rivas J., Aro E.-M., Abadía J., Abadía A. (2006) Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynthesis Research* **89**: 141–155.
- Anderson J., Chow W., De Las Rivas J. (2008) Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynthesis Research* **98**: 575–587.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195–201.
- Aro E.-M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamäki E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of Experimental Botany* **56**: 347–356.
- Ballottari M., Girardon J., Dall'Osto L., Bassi R. (2012) Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 143–157.
- Bardwell J.C.A., McGovern K., Beckwith J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**: 581–589.

- Barros T., Kühlbrandt W. (2009)** Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**: 753–772.
- Betts S.D., Lydakis-Simantiris N., Ross J.R., Yocum C.F. (1998)** The Carboxyl-Terminal Tripeptide of the Manganese-Stabilizing Protein Is Required for Quantitative Assembly into Photosystem II and for High Rates of Oxygen Evolution Activity. *Biochemistry* **37**: 14230–14236.
- Betts S.D., Ross J.R., Hall K.U., Pichersky E., Yocum C.F. (1996)** Functional reconstitution of photosystem II with recombinant manganese-stabilizing proteins containing mutations that remove the disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1274**: 135–142.
- Blanc G., Wolfe K.H. (2004)** Widespread Paleopolyploidy in Model Plant Species Inferred from Age Distributions of Duplicate Genes. *The Plant Cell Online* **16**: 1667–1678.
- Blankenship R.E. (2002)** Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell Science.
- Boekema E.J., van Breemen J.F.L., van Roon H., Dekker J.P. (2000)** Conformational Changes in Photosystem II Supercomplexes upon Removal of Extrinsic Subunits. *Biochemistry* **39**: 12907–12915.
- Bricker T.M. (1992)** Oxygen evolution in the absence of the 33-kilodalton manganese-stabilizing protein. *Biochemistry* **31**: 4623–4628.
- Bricker T.M., Frankel L.K. (2008)** The *psbO* Mutant of Arabidopsis Cannot Efficiently Use Calcium in Support of Oxygen Evolution by Photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 29022–29027.
- Bricker T.M., Frankel L.K. (2011)** Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: A critical analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**: 165–178.
- Bricker T.M., Roose J.L., Fagerlund R.D., Frankel L.K., Eaton-Rye J.J. (2012)** The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 121–142.
- Burnap R.L., Sherman L.A. (1991)** Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the manganese-stabilizing protein of photosystem II is not essential for oxygen evolution. *Biochemistry* **30**: 440–446.
- Caffarri S., Kouřil R., Kereiche S., Boekema E.J., Croce R. (2009)** Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO Journal* **28**: 3052–3063.
- Cardona T., Sedoud A., Cox N., Rutherford A.W. (2012)** Charge separation in Photosystem II: A comparative and evolutionary overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 26–43.
- Daum B., Nicastro D., Austin J., McIntosh J.R., Kühlbrandt W. (2010)** Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. *The Plant Cell Online* **22**: 1299–1312.

- Dekker J.P., Boekema E.J. (2005)** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1706**: 12–39.
- Derman A.I., Prinz W.A., Belin D., Beckwith J. (1993)** Mutations That Allow Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm of Escherichia Coli. *Science* **262**: 1744–1747.
- Enami I., Kamo M., Ohta H., Takahashi S., Miura T., Kusayanagi M., Tanabe S., Kamei A., Motoki A., Hirano M., Tomo T., Satoh K. (1998)** Intramolecular Cross-linking of the Extrinsic 33-kDa Protein Leads to Loss of Oxygen Evolution but Not Its Ability of Binding to Photosystem II and Stabilization of the Manganese Cluster. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 4629–4634.
- Ettinger W.F., Theg S.M. (1991)** Physiologically active chloroplasts contain pools of unassembled extrinsic proteins of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in the thylakoid lumen. *The Journal of Cell Biology* **115**: 321–328.
- Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. (2004)** Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science* **303**: 1831–1838.
- Fischer L., Lipavska H., Hausman J.-F., Opatrny Z. (2008)** Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. *BMC Plant Biology* **8**: 117.
- Frankel L.K., Bricker T.M. (1995)** Interaction of the 33-kDa extrinsic protein with photosystem II: Identification of domains on the 33-kDa protein that are shielded from NHS-biotinylation by photosystem II. *Biochemistry* **34**: 7492–7497.
- Gabdulkhakov A., Guskov A., Broser M., Kern J., Müh F., Saenger W., Zouni A. (2009)** Probing the Accessibility of the Mn₄Ca Cluster in Photosystem II: Channels Calculation, Noble Gas Derivatization, and Cocrystallization with DMSO. *Structure* **17**: 1223–1234.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005)** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, pp 571–607. [online] URL: <http://www.springer.com/life+sciences/biochemistry+%26+biophysics/book/978-1-58829-343-5>
- Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F. (1984)** Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted Photosystem II preparations. *FEBS Letters* **167**: 127–130.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000)** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *ELECTROPHORESIS* **21**: 1037–1053.
- Goulas E., Schubert M., Kieselbach T., Kleczkowski L.A., Gardeström P., Schröder W., Hurry V. (2006)** The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal* **47**: 720–734.

- Granlund I., Hall M., Kieselbach T., Schröder W.P. (2009)** Light Induced Changes in Protein Expression and Uniform Regulation of Transcription in the Thylakoid Lumen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **4**: e5649.
- Granlund I., Kieselbach T., Alm R., Schröder W.P., Emanuelsson C. (2011)** Clustering of MS spectra for improved protein identification rate and screening for protein variants and modifications by MALDI-MS/MS. *Journal of Proteomics* **74**: 1190–1200.
- Guex N., Peitsch M.C. (1997)** SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *ELECTROPHORESIS* **18**: 2714–2723.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. (2009)** Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 334–342.
- Hall, T. A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*: 95–98.
- Hankamer B., Morris E., Nield J., Carne A., Barber J. (2001a)** Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Letters* **504**: 142–151.
- Hankamer B., Morris E., Nield J., Gerle C., Barber J. (2001b)** Three-Dimensional Structure of the Photosystem II Core Dimer of Higher Plants Determined by Electron Microscopy. *Journal of Structural Biology* **135**: 262–269.
- Hashimoto A., Ettinger W.F., Yamamoto Y., Theg S.M. (1997)** Assembly of Newly Imported Oxygen-Evolving Complex Subunits in Isolated Chloroplasts: Sites of Assembly and Mechanism of Binding. *The Plant Cell* **9**: 441–452.
- Hashimoto A., Yamamoto Y., Theg S.M. (1996)** Unassembled subunits of the photosynthetic oxygen-evolving complex present in the thylakoid lumen are long-lived and assembly-competent. *FEBS Letters* **391**: 29–34.
- Heredia P., De Las Rivas J. (2003)** Calcium-Dependent Conformational Change and Thermal Stability of the Isolated PsbO Protein Detected by FTIR Spectroscopy. *Biochemistry* **42**: 11831–11838.
- Hillier W., Hendry G., Burnap R.L., Wydrzynski T. (2001)** Substrate Water Exchange in Photosystem II Depends on the Peripheral Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 46917–46924.
- Ho F.M., Styring S. (2008)** Access channels and methanol binding site to the CaMn₄ cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**: 140–153.
- Hutchison R.S., Betts S.D., Yocum C.F., Barry B.A. (1998)** Conformational Changes in the Extrinsic Manganese Stabilizing Protein Can Occur upon Binding to the Photosystem II Reaction Center: An Isotope Editing and FT-IR Study. *Biochemistry* **37**: 5643–5653.

- Chow W.S., Kim E.-H., Horton P., Anderson J.M. (2005)** Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochemical & Photobiological Sciences* **4**: 1081.
- Iniguez-Luy F.L., Federico M.L. (2011)** The Genetics of *Brassica napus* In: Schmidt R, Bancroft I (eds) Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Springer New York, pp 291–322.
- Jansson S. (1999)** A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **4**: 236–240.
- Kamiya N., Shen J.-R. (2003)** Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 98–103.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. (2002)** MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059–3066.
- Kebekus U., Messinger J., Renger G. (1995)** Structural Changes in the Water-Oxidizing Complex Monitored via the pH Dependence of the Reduction Rate of Redox State S1 by Hydrazine and Hydroxylamine in Isolated Spinach Thylakoids. *Biochemistry* **34**: 6175–6182.
- Kern J., Alonso-Mori R., Hellmich J., Tran R., Hattne J., Laksmono H., Glöckner C., Echols N., Sierra R.G., Sellberg J., Lassalle-Kaiser B., Gildea R.J., Glatzel P., Grosse-Kunstleve R.W., Latimer M.J., McQueen T.A., DiFiore D., Fry A.R., Messerschmidt M., Miahnahri A., Schafer D.W., Seibert M.M., Sokaras D., Weng T.-C., Zwart P.H., White W.E., Adams P.D., Bogan M.J., Boutet S., Williams G.J., Messinger J., Sauter N.K., Zouni A., Bergmann U., Yano J., Yachandra V.K. (2012)** Room temperature femtosecond X-ray diffraction of photosystem II microcrystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 9721–9726.
- Kieselbach T., Bystedt M., Hynds P., Robinson C., Schröder W.P. (2000)** A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the Arabidopsis chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Letters* **480**: 271–276.
- Kouřil R., Dekker J.P., Boekema E.J. (2012)** Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 2–12.
- Kouřil R., Oostergetel G.T., Boekema E.J. (2011)** Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**: 368–374.
- Kruk J., Burda K., Jemiola-Rzemińska M., Strzalka K. (2003)** The 33 kDa Protein of Photosystem II Is a Low-Affinity Calcium- and Lanthanide-Binding Protein†. *Biochemistry* **42**: 14862–14867.
- Laemmli U. (1970)** CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. *Nature* **227**: 680–685.

- De Las Rivas J., Balsera M., Barber J. (2004)** Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends in Plant Science* **9**: 18–25.
- De Las Rivas J., Barber J. (2004)** Analysis of the Structure of the PsbO Protein and its Implications. *Photosynthesis Research* **81**: 329–343.
- De Las Rivas J., Heredia P., Roman A. (2007)** Oxygen-evolving extrinsic proteins (PsbO,P,Q,R): Bioinformatic and functional analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**: 575–582.
- Linsmaier E.M., Skoog F. (1965)** Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **18**: 100–127.
- Liu Z., Hanchi Yan, Kebin Wang, Tingyun Kuang, Jiping Zhang, Lulu Gui, Xiaomin An, Wenrui Chang (2004)** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**: 287–292.
- Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J. (2005)** Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438**: 1040–1044.
- Lundin B., Hansson M., Schoefs B., Vener A.V., Spetea C. (2007a)** The Arabidopsis PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *The Plant Journal* **49**: 528–539.
- Lundin B., Nurmi M., Rojas-Stuetz M., Aro E.-M., Adamska I., Spetea C. (2008)** Towards understanding the functional difference between the two PsbO isoforms in *Arabidopsis thaliana* —insights from phenotypic analyses of *psbo* knockout mutants. *Photosynthesis Research* **98**: 405–414.
- Lundin B., Thuswaldner S., Shutova T., Eshaghi S., Samuelsson G., Barber J., Andersson B., Spetea C. (2007b)** Subsequent events to GTP binding by the plant PsbO protein: Structural changes, GTP hydrolysis and dissociation from the photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**: 500–508.
- Lydakis-Simantiris N., Hutchison R.S., Betts S.D., Barry B.A., Yocum C.F. (1999)** Manganese Stabilizing Protein of Photosystem II Is a Thermostable, Natively Unfolded Polypeptide. *Biochemistry* **38**: 404–414.
- Mavankal G., McCain D.C., Bricker T.M. (1986)** Effects of chloride on paramagnetic coupling of manganese in calcium chloride-washed photosystem II preparations. *FEBS Letters* **202**: 235–239.
- Mayfield S.P., Bennoun P., Rochaix J.D. (1987)** Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO Journal* **6**: 313–318.
- Messinger J., Renger G. (1994)** Analyses of pH-Induced Modifications of the Period Four Oscillation of Flash-Induced Oxygen Evolution Reveal Distinct Structural Changes of

the Photosystem II Donor Side at Characteristic pH Values. *Biochemistry* **33**: 10896–10905.

Miqyass M., van Gorkom H., Yocum C. (2007) The PSII calcium site revisited. *Photosynthesis Research* **92**: 275–287.

Miyao M., Murata N. (1984a) Effect of urea on Photosystem II particles. Evidence for an essential role of the 33 kilodalton polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **765**: 253–257.

Miyao M., Murata N. (1984b) Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions. *FEBS Letters* **170**: 350–354.

Murakami R., Ifuku K., Takabayashi A., Shikanai T., Endo T., Sato F. (2005) Functional dissection of two Arabidopsis PsbO proteins. *FEBS Journal* **272**: 2165–2175.

Murray J.W., Barber J. (2006) Identification of a Calcium-Binding Site in the PsbO Protein of Photosystem II. *Biochemistry* **45**: 4128–4130.

Murray J.W., Barber J. (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel. *Journal of Structural Biology* **159**: 228–237.

Nield J., Balsera M., Rivas J.D.L., Barber J. (2002) Three-dimensional Electron Cryo-microscopy Study of the Extrinsic Domains of the Oxygen-evolving Complex of Spinach ASSIGNMENT OF THE PsbO PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 15006–15012.

Nield J., Barber J. (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**: 353–361.

Nikitina J., Shutova T., Melnik B., Chernyshov S., Marchenkov V., Semisotnov G., Klimov V., Samuelsson G. (2008) Importance of a single disulfide bond for the PsbO protein of photosystem II: protein structure stability and soluble overexpression in *Escherichia coli*. *Photosynthesis Research* **98**: 391–403.

Ohta H., Suzuki T., Ueno M., Okumura A., Yoshihara S., Shen J.-R., Enami I. (2003) Extrinsic proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* **270**: 4156–4163.

Ono T.-A., Inoue Y. (1983) Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O₂-evolving PS II particles by divalent salt-washing. *FEBS Letters* **164**: 255–260.

Pan X., Mei Li, Tao Wan, Longfei Wang, Chenjun Jia, Zhiqiang Hou, Xuelin Zhao, Jiping Zhang, Wenrui Chang (2011) Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**: 309–315.

- Popelkova H., Commet A., Kuntzleman T., Yocum C.F. (2008)** Inorganic Cofactor Stabilization and Retention: The Unique Functions of the Two PsbO Subunits of Eukaryotic Photosystem II. *Biochemistry* **47**: 12593–12600.
- Popelkova H., Im M.M., Yocum C.F. (2002)** N-Terminal Truncations of Manganese Stabilizing Protein Identify Two Amino Acid Sequences Required for Binding of the Eukaryotic Protein to Photosystem II and Reveal the Absence of One Binding-Related Sequence in Cyanobacteria. *Biochemistry* **41**: 10038–10045.
- Popelkova H., Im M.M., Yocum C.F. (2003a)** Binding of Manganese Stabilizing Protein to Photosystem II: Identification of Essential N-Terminal Threonine Residues and Domains that Prevent Nonspecific Binding. *Biochemistry* **42**: 6193–6200.
- Popelkova H., Wyman A., Yocum C. (2003b)** Amino acid sequences and solution structures of manganese stabilizing protein that affect reconstitution of Photosystem II activity. *Photosynthesis Research* **77**: 21–34.
- Popelkova H., Yocum C.F. (2011)** PsbO, the manganese-stabilizing protein: Analysis of the structure–function relations that provide insights into its role in photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**: 179–190.
- Prinz W.A., Åslund F., Holmgren A., Beckwith J. (1997)** The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coli Cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 15661–15667.
- Renger G. (2011)** Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**: 35–43.
- Renger G., Renger T. (2008)** Photosystem II: The machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynthesis Research* **98**: 53–80.
- Roose J., Wegener K., Pakrasi H. (2007)** The extrinsic proteins of Photosystem II. *Photosynthesis Research* **92**: 369–387.
- Roose J.L., Yocum C.F., Popelkova H. (2011)** Binding Stoichiometry and Affinity of the Manganese-Stabilizing Protein Affects Redox Reactions on the Oxidizing Side of Photosystem II. *Biochemistry* **50**: 5988–5998.
- Rumpha M.E., Worful J.M., Lee J., Kannan K., Tyler M.S., Bhattacharya D., Moustafa A., Manhart J.R. (2008)** Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug Elysia chlorotica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 17867–17871.
- Seidler A. (1996)** The extrinsic polypeptides of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1277**: 35–60.
- Shi L.-X., Hall M., Funk C., Schröder W.P. (2012)** Photosystem II, a growing complex: Updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 13–25.

- Shure M., Wessler S., Fedoroff N. (1983)** Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* **35**: 225–233.
- Shutova T., Irrgang K.-D., Shubin V., Klimov V.V., Renger G. (1997)** Analysis of pH-Induced Structural Changes of the Isolated Extrinsic 33 Kilodalton Protein of Photosystem II. *Biochemistry* **36**: 6350–6358.
- Shutova T., Klimov V.V., Andersson B., Samuelsson G. (2007)** A cluster of carboxylic groups in PsbO protein is involved in proton transfer from the water oxidizing complex of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**: 434–440.
- Shutova T., Nikitina J., Deikus G., Andersson B., Klimov V., Samuelsson G. (2005)** Structural Dynamics of the Manganese-Stabilizing Protein Effect of pH, Calcium, and Manganese²⁺. *Biochemistry* **44**: 15182–15192.
- Schubert M., Petersson U.A., Haas B.J., Funk C., Schröder W.P., Kieselbach T. (2002)** Proteome Map of the Chloroplast Lumen of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 8354–8365.
- Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J., Bell C.D., Paterson A.H., Zheng C., Sankoff D., dePamphilis C.W., Wall P.K., Soltis P.S. (2009)** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.
- Spetea C., Hundal T., Lohmann F., Andersson B. (1999)** GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 6547–6552.
- Spetea C., Hundal T., Lundin B., Heddad M., Adamska I., Andersson B. (2004)** Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1409–1414.
- Standfuss J., Scheltinga A.C.T. van, Lamborghini M., Kühlbrandt W. (2005)** Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO Journal* **24**: 919–928.
- Suorsa M., Aro E.-M. (2007)** Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants. *Photosynthesis Research* **93**: 89–100.
- Suzuki T., Minagawa J., Tomo T., Sonoike K., Ohta H., Enami I. (2003)** Binding and Functional Properties of the Extrinsic Proteins in Oxygen-Evolving Photosystem II Particle from a Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii* having His-tagged CP47. *Plant and Cell Physiology* **44**: 76–84.
- Svensson B., Tiede D.M., Barry B.A. (2002)** Small-Angle X-ray Scattering Studies of the Manganese Stabilizing Subunit in Photosystem II. *J Phys Chem B* **106**: 8485–8488.
- Tanaka S., Kawata Y., Wada K., Hamaguchi K. (1989)** Extrinsic 33-kilodalton protein of spinach oxygen-evolving complexes: kinetic studies of folding and disulfide reduction. *Biochemistry* **28**: 7188–7193.

- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796.
- Thornton L.E., Ohkawa H., Roose J.L., Kashino Y., Keren N., Pakrasi H.B. (2004)** Homologs of Plant PsbP and PsbQ Proteins Are Necessary for Regulation of Photosystem II Activity in the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *The Plant Cell Online* **16**: 2164–2175.
- Tikkanen M., Aro E.-M. (2012)** Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 232–238.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. (2011)** Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**: 55–60.
- Weng J., Tan C., Shen J.-R., Yu Y., Zeng X., Xu C., Ruan K. (2004)** pH-Induced Conformational Changes in the Soluble Manganese-Stabilizing Protein of Photosystem II. *Biochemistry* **43**: 4855–4861.
- Williamson A. (2008)** Structural and functional aspects of the MSP (PsbO) and study of its differences in thermophilic versus mesophilic organisms. *Photosynthesis Research* **98**: 365–389.
- Williamson A., Conlan B., Hillier W., Wydrzynski T. (2011)** The evolution of Photosystem II: insights into the past and future. *Photosynthesis Research* **107**: 71–86.
- Wyman A., Yocum C. (2005)** Structure and Activity of the Photosystem II Manganese-Stabilizing Protein: Role of the Conserved Disulfide Bond. *Photosynthesis Research* **85**: 359–372.
- Xu Q., Bricker T.M. (1992)** Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. Two molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 25816–25821.
- Yamamoto Y., Ishikawa Y., Nakatani E., Yamada M., Zhang H., Wydrzynski T. (1998)** Role of an Extrinsic 33 Kilodalton Protein of Photosystem II in the Turnover of the Reaction Center-Binding Protein D1 during Photoinhibition†. *Biochemistry* **37**: 1565–1574.
- Yamamoto Y., Nakayama S., Cohn C.L., Krogmann D.W. (1987)** Highly efficient purification of the 33-, 24-, and 18-kDa proteins in spinach photosystem II by butanol/water phase partitioning and high-performance liquid chromatography. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **255**: 156–161.
- Yi X., Hargett S.R., Frankel L.K., Bricker T.M. (2009)** The PsbP protein, but not the PsbQ protein, is required for normal thylakoid architecture in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **583**: 2142–2147.
- Yi X., McChargue M., Laborde S., Frankel L.K., Bricker T.M. (2005)** The Manganese-stabilizing Protein Is Required for Photosystem II Assembly/Stability and Photoautotrophy in Higher Plants. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 16170–16174.

Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Kraub N., Saenger W., Orth P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**: 739.